ISOLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG DER MEMBRANPROTEINE SYNAPTISCHER VESIKEL

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Christiane Richter-Landsberg
aus Göttingen

Göttingen 1975

ISOLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG DER MEMBRANPROTEINE SYNAPTISCHER VESIKEL

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Christiane Richter-Landsberg
aus Göttingen

Göttingen 1975

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

D 7

Referent: Prof. Dr. G. Gottschalk

Korreferent: Prof. Dr. G. Jacobi

Tag der mündlichen Prüfung: 30. Oktober 1975

Inhaltsverzeichnis

Seite

1. Einleitung 1

2. Theoretischer Teil 7

2.1. Isolierung der synaptischen Vesikel aus Rindercortex 7
2.2. Reinheitsprüfung der synaptischen Vesikel 10
2.2.1. Enzymatische Bestimmungen 11
2.2.2. Elektronenmikroskopische Untersuchung 14
2.2.3. Untersuchung der Aminosäuren 17
2.3. Charakterisierung der Membranproteine synaptischer Vesikel mit Hilfe von Polyacrylamidgel-Elektrophorese 20
2.3.1. Trennung der Vesikelproteine im diskontinuierlichen Tris/Cl-Tris/Glycin-Puffersystem 21
2.3.2. Trennung der Vesikelproteine im kontinuierlichen Phosphatpuffersystem 32
2.3.3. Glykoproteine der synaptischen Vesikel 32
2.3.4. Triton-Extraktion der Membranproteine synaptischer Vesikel 35
2.3.5. Charakterisierung des Hauptproteins des Tritonextraktes 40
2.3.5.1. Auf Mikrogelen 40
2.3.5.2. Qualitative Bestimmung zur Aminosäurenzusammensetzung der Hauptbande 41
2.4. SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese zur Charakterisierung von Membranproteinen 43
2.4.1. Zur Theorie der Elektrophorese 45

Seite

2.4.1.1. Kontinuierliche Elektrophorese 48
2.4.1.2. Diskontinuierliche Gelelektrophorese 50
2.4.2. SDS-Gelelektrophorese im diskontinuierlichen Puffersystem 58
2.4.2.1. Behandlung der Proteinproben 59
- SDS-Extraktion 59
- Reduktion der Proteine 60
2.4.2.2. Untersuchung der bei den Trennungen aufgetretenen Artefakte 64
- Verschiebung des Bandenbildes zur Anode 64
- Ausbildung von artefiziellen Banden durch SDS-Mangel 69
2.4.3. SDS-Gelelektrophorese im kontinuierlichen Puffersystem 73
2.4.4. Das Wanderungsverhalten von Reduktionsmitteln in verschiedenen SDS-Elektrophoresepuffersystemen 76
2.4.5. Reduktion eines Proteins während der Elektrophorese 78
2.4.6. Carboxymethylierung der reduzierten Probe 82
2.5. Zusammenfassung der Ergebnisse 84
2.6. Schlußfolgerungen 85

3. Experimenteller Teil 89

3.1. Beschreibung der Versuche 89
3.1.1. Isolierung der Membranproteine 89
3.1.1.1. Isolierung der synaptischen Vesikel 89

Seite

3.1.1.2. Isolierung der Membranproteine des Totalhomogenats 94
3.1.1.3. Isolierung der Erythrozytenmembranen 94
3.1.2. Proteinbestimmung nach LOWRY 95
3.1.3. Enzymatische Bestimmungen 97
3.1.4. Elektronenmikroskopie 99
3.1.4.1. Negativkontrastierung 99
3.1.4.2. Positivkontrastierung 99
3.1.5. Mikrobestimmung der Aminosäuren 101
3.1.5.1. Auswertung der Chromatogramme 103
3.1.6. Gelelektrophorese 103
3.1.6.1. Bereitung der Gele 104
3.1.6.2. Entfernung der Gele aus dem Glasröhrchen 104
3.1.6.3. Bereitung der Proben zum Auftragen auf die Gele 105
- SDS-Extraktion 105
- Tritonextraktion 105
3.1.6.4. Anfärbung der Proteinbanden im Gel 106
3.1.6.5. Auswertung der Gele 107
3.1.6.6. Auswertung der Densitogramme 107
3.1.6.7. Puffersysteme und Gellösungen 108
- Diskontinuierliches Puffersystem 108
- Kontinuierliches Puffersystem 109
3.1.6.8. Isolierung einer Proteinbande aus dem Gel 110
3.1.7. Mikroelektrophorese an kontinuierlichen Gradientengelen 111

4. Literaturverzeichnis 114

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41534921_0006

1. Einleitung

Biologische Membranen stehen als wichtige Zellbestandteile zunehmend im Interesse wissenschaftlicher Forschung. Ihre vielfältigen Funktionen ziehen die Aufmerksamkeit vieler Disziplinen auf sich, von der klassischen Biologie über Physiologie und Biochemie bis hin zur experimentellen und theoretischen Physik (1-3).

Membranen ermöglichen sowohl eine Abgrenzung der Zelle nach außen als auch einen ständigen Stoffaustausch mit dem umgebenden Milieu. Sie haben also neben Schutzfunktionen auch wichtige Aufgaben im Stoffwechselgeschehen zu erfüllen. So ist die Cytoplasmamembran die "osmotische Schranke" der Zelle (4), die den Ein- und Austritt von Stoffen kontrolliert. Neben dem passiven Transport von Stoffen regulieren Membranen durch ihnen eigene substratspezifische Permeasesysteme auch deren aktiven Transport.

Ob es sich um die Membran eines Bakteriums, um eine tierische oder pflanzliche Membran handelt, oder auch um solche von intrazellulären Bestandteilen, das elektronenmikroskopische Bild biologischer Membranen ist überraschend einheitlich. Die Gesamtdicke der Membranen beträgt im allgemeinen 75-100 Å , dabei schließen zwei dunkle osmiophile Schichten von jeweils 20-30 Å Dicke eine hellere von 40-50 Å ein (4). Diese weitgehende strukturelle Übereinstimmung führte zu dem Begriff der E l e m e n t a r m e m b r a n (unit

membrane), der 1957 von ROBERTSON (5) eingeführt wurde. Sein Membranmodell stellt eine Modifizierung desjenigen von DANIELLI u. DAVSON (6) von 1935 dar. Nach diesen beiden Modellen besteht eine Membran aus einer Lipiddoppelschicht (lipid bilayer), die von zwei monomolekularen Proteinschichten umgeben wird. Die hydrophoben Enden der Lipide weisen in das Membraninnere, die hydrophilen Enden sind der umhüllenden Proteinschicht zugekehrt. Nach ROBERTSON (5) liegen die Proteine in einer Faltblattstruktur als "Monolayer" vor, während DANIELLI u. DAVSON (6) eine globuläre Form annehmen.

An der Hypothese von ROBERTSON (5) wird in neueren Arbeiten Kritik geübt (der Übersichtsartikel von HENDLER (7) gibt weitere Zitate an). Neben einigen anderen Modellen wird ihr vor allem das Modell des "flüssigen Mosaiks" (fluid mosaic) von SINGER u. NICOLSON (8) gegenübergestellt, nach dem die Membran eine viskose Matrix von amphiphatischen Proteinen und Lipiden darstellt, in dem die Proteine in globulärer Form in eine Lipiddoppelschicht eingebettet sind.

Ausgedehnte Untersuchungen der Phasenübergänge in künstlichen und natürlichen Membranen (9, 10) zeigen, daß gerade im Bereich physiologischer Temperaturen und Ionenstärken strukturelle Umwandlungen der Lipiddoppelschicht stattfinden können. Die Membran liegt je nach den experimentellen oder physiologischen Bedingungen in einem mehr oder weniger festen oder flüssigen Zustand vor. Es ist anzunehmen, daß der Transport und die Diffusion von Ionen und kleineren Molekülen in

"flüssigen Membranen" begünstigt sind.

Hauptbestandteile aller Membranen sind Proteine und Lipide. Sowohl Proteine als auch Lipide sind amphiphatisch, d.h., sie haben ein polares und ein apolares Ende. Die polaren Regionen der Proteine sind zur Membranoberfläche hin orientiert, sie enthalten die ionischen Aminosäuren und die kovalent gebundenen Kohlenhydrate (8). Dagegen ist die apolare Region eingebettet in das hydrophobe Innere der Membran. Im allgemeinen beträgt der Lipidanteil der Membranen 40-60 %. Extrem arm an Lipiden ist die innere Membran der Mitochondrien mit einem Proteinanteil von 80 % (11), wogegen das Myelin des Nervensystems mit einem Lipidanteil von 75 % als die lipidreichste Membran bekannt ist (11).

Viele Untersuchungen, die zu der Hypothese der Elementarmembran führten, wurden am Myelin des peripheren Nervensystems durchgeführt (12). Zahlreiche grundlegende Erkenntnisse wurden auch durch die Untersuchung der Membranen von Mitochondrien (13) und Erythrozyten (14, 15) gewonnen.

Die Membranen des Nervensystems sind zwar im Hinblick auf ihr elektrisches Verhalten schon vielfach untersucht und charakterisiert worden (16), jedoch ist bisher noch wenig bekannt über ihre molekulare Zusammensetzung, weil es sehr schwierig ist, für biochemische Untersuchungen genügend Material zu erhalten, das nicht durch andere Membranen des untersuchten Nervengewebes verunreinigt ist (17). Fortschritte für die Untersuchung der Membranproteine des

Nervensystems wurden durch subzelluläre Fraktionierungsmethoden erzielt. So wurde z.B. gefunden, daß sich die präsynaptischen Nervenendigungen während der Homogenisation in isoosmotischem Medium zu geschlossenen intakten Strukturen, den sogenannten Synaptosomen, abkapseln (18). Sie behalten dabei weitgehend die Morphologie der ursprünglichen synaptischen Endkolben (boutons terminaux) und zeigen in vielem die Eigenschaften von kernlosen Miniaturzellen (19).

Isolierte Synaptosomen zeigen über längere Zeit einen Stoffwechsel und sind in der Lage, durch einen aktiven "Carrier-Mechanismus" eine Reihe von kleinen Molekülen aufzunehmen (19). Besonders auffällig ist ihre hohe Affinität für Transmittersubstanzen und deren Vorstufen. Ihre Funktion als Speicherort für Transmittersubstanzen wie Acetylcholin, Noradrenalin und Serotonin gilt inzwischen als gesichert (19), zumal auch die Freigabe der Transmittersubstanzen nach elektrischer Stimulation der Synaptosomen von mehreren Autoren gezeigt werden konnte (19).

Die Synaptosomen sind osmotisch labil; unter hypoosmotischen Bedingungen platzen sie und geben ihren Inhalt frei (19, 20). Aus dem dabei entstandenen Gemisch von Mitochondrien, synaptosomalen Plasmamembranen und synaptischen Vesikeln können durch verschiedene Zentrifugationsmethoden die synaptischen Vesikel angereichert werden.

Die synaptischen Vesikel des zentralen Nervensystems der Säugetiere haben einen Durchmesser von etwa 300-600 Å

und sind von einer charakteristischen Doppelmembran umgeben. Der Membrananteil ist, verglichen mit der Gesamtgröße der Vesikel, ungewöhnlich hoch. Synaptische Vesikel befinden sich immer dort, wo Erregungen übertragen werden, und zwar im präsynaptischen Teil der Synapsen. Es gilt inzwischen als gesichert, daß synaptische Vesikel als Speicherorte für die Neurotransmitter Acetylcholin und die Catecholamine dienen (16, 19). Sie sind also an der Erregungsübertragung der Neurone untereinander ebenso beteiligt wie an der zwischen Zellen der Sinnesorgane und Neuronen und zwischen Neuronen und Effektoren, wie z.B. Drüsenzellen und Muskeln. Der molekulare Mechanismus der Aufnahme und Abgabe der Transmittersubstanzen ist noch nicht geklärt. Es wird angenommen, daß zur Freigabe der Transmittersubstanzen die Vesikel durch Exocytose mit der synaptosomalen Plasmamembran verschmelzen und später wieder von ihr abgelöst werden (19).

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, zur Kenntnis synaptischer Vesikel und ihrer Membranproteine beizutragen. Hierzu sollen die synaptischen Vesikel durch subzelluläre Fraktionierung gewonnen und durch verschiedene Methoden auf ihre Reinheit geprüft werden. Weiterhin soll geprüft werden, ob synaptische Vesikel Aminosäuren enthalten. Diese Untersuchung läßt Aussagen in bezug auf die Reinheit der Fraktionen zu und könnte darüber hinaus Hinweise auf mögliche Funktionen geben, da einigen Aminosäuren Transmitter-

funktionen zugeordnet werden. Da die Membranproteine vermutlich an dem molekularen Mechanismus der Bindung und Abgabe der Transmittersubstanzen wesentlich beteiligt sind (19), sollen vor allem die Membranproteine der Vesikel charakterisiert werden. Es ist ferner beabsichtigt, auch die Glykoproteine der synaptischen Vesikel zu untersuchen, da diese bei dem oben erwähnten Vorgang der Exocytose wichtige Funktionen erfüllen (21); denn Glykoproteine haben als Bestandteile von Zelloberflächen wichtige Aufgaben bei Erkennungsmechanismen der Zellen untereinander (22). Zur Charakterisierung der Membranproteine wird vor allem die SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese eingesetzt, die sich als wirksame analytische Methode zur Untersuchung von wasserunlöslichen Membranproteinen bewährt hat (23). Hierzu müssen einige grundlegende Untersuchungen durchgeführt werden, die über die Proteinbehandlung vor der Elektrophorese und die während der Elektrophorese einzuhaltenden Bedingungen Aufschluß geben, um so einwandfreie und reproduzierbare Trennergebnisse zu erhalten.

2. Theoretischer Teil

2.1. Isolierung der synaptischen Vesikel aus Rindercortex

Zur Isolierung synaptischer Vesikel wurden bisher zumeist Säugetiere (Ratte, Meerschweinchen) herangezogen (24-27), seit einigen Jahren arbeiten verschiedene Gruppen auch mit Meerestieren wie dem Tintenfisch (Octopus eledone) und einigen Torpedoarten (Torpedo marmorata, Torpedo torpedo) (28, 29). Letztere haben sich als Ausgangsmaterial für die Isolierung von synaptischen Vesikeln und zur Untersuchung der synaptischen Transmission als besonders günstig erwiesen, da das elektrische Organ der Tiere außerordentlich reichhaltig an Synapsen ist. Ein weiterer Vorteil ist außerdem, daß die Neurone des elektrischen Organs Acetylcholin als einzigen Neurotransmitter enthalten und so homogene Präparationen von synaptischen Vesikeln erhalten werden können (19). Die Isolierung von Synaptosomen und synaptischen Vesikeln aus dem Nervengewebe von Säugetieren führt dagegen zu heterogenen Präparationen, die verschiedene Transmittersubstanzen enthalten (19,25).

Nach Untersuchungen von MORGAN et al. (25) haben die Proteine der synaptischen Vesikel nur einen Anteil von 0.02 % am Gesamtproteingehalt des Ausgangsmaterials. Deshalb müssen zur Präparation und den nachfolgenden Untersuchungen der Vesikelproteine recht große Ausgangsmengen

eingesetzt werden. Da Meerestiere der erwähnten Art in unseren Breitengraden schwer erhältlich sind, wurde Rinderhirn als Ausgangsmaterial gewählt, zumal Rinder dem Menschen phylogenetisch bedeutend näher stehen. Die Ergebnisse dieser bisher noch nicht untersuchten Art können mit den Untersuchungsergebnissen bei anderen Tierarten verglichen werden, um dadurch eventuell Aussagen zu ermöglichen, die von allgemeiner Gültigkeit sind.

Zur Isolierung der synaptischen Vesikel muß von einer synaptosomalen Fraktion ausgegangen werden (24). Synaptosomen entstehen bei der Homogenisation des Nervengewebes unter isoosmotischen Bedingungen. Durch Dichtegradientenzentrifugation können sie von den übrigen Bestandteilen weitgehend abgetrennt werden (18). Die direkte Isolierung der synaptischen Vesikel aus dem Gesamtgewebe ohne Vorfraktionierung ist nicht zu empfehlen, da dann die Gefahr besonders groß ist, daß auch andere Membranfragmente vesikulieren, die nur sehr schwer von den synaptischen Vesikeln abzutrennen sind.

Anreicherung der Synaptosomen: Graue Substanz des Rinderhirns wurde in 0.32 M Saccharoselösung homogenisiert und die dabei entstandenen Synaptosomen durch Zentrifugation abgetrennt. Durch mehrfaches Waschen und Zentrifugieren im gleichen Medium wurde die an Synaptosomen angereicherte Fraktion von löslichen Proteinen und Kernen gereinigt (18). Zur Freisetzung der synaptischen Vesikel wurden

die Synaptosomen einem osmotischen Schock unterworfen (18, 26). Hierzu wurde das synaptosomale Sediment in hypoosmotischem Medium (1 mM Phosphatpuffer pH 7.5) homogenisiert und die freigewordenen Vesikel anschließend aus dem Partikelgemisch isoliert.

Anreicherung der synaptischen Vesikel: Da die synaptischen Vesikel etwa die gleiche Dichte wie eine O.4 M Saccharoselösung haben, schweben oder flotieren sie in einer solchen Lösung (24). Nach WHITTAKER et al. (18) wird das nach dem osmotischen Schock erhaltene Homogenat auf einen Saccharosegradienten (O.4 M - O.6 M) aufgetragen und nach zweistündiger Zentrifugation die Fraktion, die sich im Bereich von O.4 M Saccharose sammelt, abgenommen. Gleichartige Aufarbeitungen wurden mit der aus Rindercortex erhaltenen synaptosomalen Fraktion durchgeführt. Elektronenmikroskopische und enzymatische Untersuchungen zeigten jedoch, daß die so erhaltenen Präparationen mit Plasmamembranen und mikrosomalem Material sehr verunreinigt waren. Da bei Verwendung von Rinderhirn dieses Vorgehen zur Isolierung von synaptischen Vesikeln demnach nicht so gute Ergebnisse wie bei der Aufarbeitung von Rattenhirnen lieferte, wurde die Methode von WHITTAKER et al. (18) variiert und mit Zwischenschritten anderer Autoren kombiniert (25), um so die beste Isolierungsmethode für Vesikel aus Rindercortex zu finden.

Nach Durchführung verschiedener Variationen, wobei vor

allem die Konzentration der Zuckergradienten und die Zentrifugationszeiten geändert wurden, konnte eine Methode ausgearbeitet werden, die für die Präparation von synaptischen Vesikeln aus Rinderhirn jetzt geeignet ist.

Danach wurde die angereicherte Synaptosomenfraktion (s. Seite 8) in Phosphatpuffer homogenisiert (osmotischer Schock), und durch einstündige Zentrifugation wurden anschließend Mitochondrien, der größte Teil des Myelins und Plasmamembranfragmente aus dem entstandenen Gemisch entfernt. Der leicht trübe Überstand wurde mit einer 1.6 M Saccharoselösung auf eine Konzentration von 0.32 M gebracht und 7 Stunden zentrifugiert. Der so erhaltene Überstand wurde in Anlehnung an MORGAN et al. (25) durch fraktionierte Membranfiltration durch Filter absteigender Porengröße von noch vorhandenen größeren Membranfragmenten weiter gereinigt, das Filtrat anschließend mit Phosphatpuffer (1 mM, pH 7.5) vierfach verdünnt und die Vesikel durch Zentrifugation sedimentiert (Einzelheiten zur Methode s. Seite 89). Ausgehend von 90 g Rinderhirn wurden dabei durchschnittlich 2-4 mg Vesikelprotein erhalten. Ähnliche Resultate wurden von MORGAN et al. (25) für Isolierungen synaptischer Vesikel aus dem Gesamthirn der Ratten erhalten.

2.2. Reinheitsprüfung der synaptischen Vesikel

Vesikelpräparationen können durch Plasmamembranfrag-

mente, Mitochondrien, lösliche Proteine, Lysosomen und Myelin verunreinigt sein. Myelinverunreinigungen, die bei dem myelinreichen Rinderhirn leicht auftreten können, lassen sich gut elektrophoretisch und auch elektronenoptisch nachweisen.

Die nach obiger Methode isolierten Vesikelfraktionen wurden zu ihrer Charakterisierung den folgenden Reinheitsprüfungen unterzogen.

2.2.1. Enzymatische Bestimmungen

Für die synaptischen Vesikel ist bis jetzt noch kein Enzym bekannt, das als direkter und charakteristischer Marker dienen könnte. Zur Überprüfung der Reinheit einer Präparation werden daher Enzyme bestimmt, die als Marker für andere definierte Zellbestandteile gelten. Ihre Abwesenheit bzw. geringe Konzentration wird als direktes Maß für den Grad der Reinheit einer Präparation synaptischer Vesikel genommen.

a) Als Marker für lösliche (cytoplasmatische) Proteine wurde Lactatdehydrogenase (LDH) bestimmt (25).

b) Vier Enzyme wurden als Marker für Plasmamembranen von Neuronen und Glia herangezogen: Acetylcholinesterase (ACE) deutet auf mikrosomale Verunreinigungen hin. Der positive Nachweis von 5'-Mononucleotidase, Na^+-K^+-Adenosintriphosphatase (Na^+-K^+-ATPase) und alkalischer Phosphatase

ist ein Hinweis auf synaptosomale Verunreinigung (25).

c) Lysosomale Verunreinigungen werden angezeigt durch die Anwesenheit folgender Enzyme: saure Phosphatase, β-Galactosidase und β-Glucosidase (30).

d) Als Marker für Mitochondrien gilt allgemein Monoaminoxidase (MAO). Der positive Test weist auf Verunreinigungen durch die äußere Mitochondrienmembran hin (25).

Die geringen Enzymaktivitäten (s. Tab. 1) sprechen dafür, daß es sich bei den vorliegenden Fraktionen um hoch angereicherte Vesikelpräparationen handelt. Die Werte sind vergleichbar mit den Ergebnissen der Enzymbestimmungen von MORGAN et al. (25), deren Vesikelpräparationen von Rattenhirnen stammen und einen Reinheitsgrad von ca. 90 % haben.

Aus den für die vorliegenden Präparationen durchgeführten Aktivitätsbestimmungen kann für die Vesikel geschlossen werden, daß keine Verunreinigungen durch Mitochondrienmembranen vorliegen. Die Verunreinigung durch Lysosomen liegt, wenn der Wert auf eine Lysosomenpräparation bezogen wird, unter 1 %. Auch der Anteil an löslichen Proteinen ist mit weniger als 5 % nicht erheblich. Wie bei MORGAN et al. (25) besteht jedoch bei den hier vorliegenden Präparationen das Problem der Verunreinigung durch Plasmamembranen. Ihr Anteil liegt auch nach der Membranfiltration noch bei etwa 10 %. Diese Ergebnisse konnten durch elektronenmikroskopische Untersuchungen bestätigt werden.

Tabelle 1. Enzymaktivitäten[1] des Totalhomogenats und der synaptischen Vesikel in Ratte und Rind

Enzym	Totalhomogenat (Rind) [2]	synaptische Vesikel (Rind) [2]	Totalhomogenat (Ratte)	synaptische Vesikel (Ratte) [3]	Referenzfraktionen (Ratte)
Lactatdehydrogenase	30.0	2.7	68.3 (30)	0.83	144.8 Lösliches Protein (25)
saure Phosphatase	15.6	0.3	30.2 ± 15 (31)	8.0	150 Lysosomenanreicheerung (25)
β-Galactosidase	0.06	0.018	keine Angaben in Literatur	0.015	0.24 Lysosomenanreicherung (25)
β- Glucosidase	0.09	0.04	keine Angaben in Literatur	0.018	0.3 Lysosomenanreicherung (25)
Na^+-K^+-ATPase	13.2	1.8	8.9 (30)	4.3	103.1 SPM [4] (25)
5'-Nucleotidase	1.5	0.6	1.14 (30)	0.31	1.2 SPM [4] (21)
alkalische Phosphatase	9.0	0.18	19.0 ± 5 (31)	1.6	2.3 SPM [4] (21)
Acetylcholinesterase	1.8	0.6	6.3 (30)	0.5	8.5 SPM [4] (21)
Monoaminoxidase	0.016	nn [5]	keine Angaben in Literatur	nn [5]	0.18 Mitochondrien (25)

1) Einheiten: µMol/mg Protein pro Stunde. 2) diese Arbeit. 3) nach MORGAN et al. (25).
4) SPM = synaptosomale Plasmamembranen. 5) nn = nicht nachweisbar.

2.2.2. Elektronenmikroskopische Untersuchung

Zur elektronenmikroskopischen Reinheitsprüfung wurden zwei Verfahren angewendet.

Negativkontrastierung. Das Verfahren der Negativkontrastierung eignet sich zur schnellen Überprüfung einer Präparation. Die Vesikel sind als helle runde Körperchen vor einem dunklen Hintergrund zu sehen. Teilweise diffundiert das Kontrastmittel auch schon in die Vesikel, die dann dunkel erscheinen.

Positivkontrastierung. Hierdurch werden zwar genauere Abbildungen einer Präparation erhalten, jedoch ist das Ergebnis einer solchen Untersuchung erst nach frühestens einer Woche ersichtlich. Die Vesikel werden hierzu durch Zentrifugation zu einem festen Niederschlag sedimentiert, mit Glutaraldehyd vorfixiert und anschließend durch Osmiumsäure nachfixiert. Nach der Entwässerung in Alkohol und Propylenoxid ansteigender Konzentration wird die Präparation in Epon eingebettet. Die mit einem Ultramikrotom erhaltenen Ultradünnschnitte (ca. 3000 Å) werden mit Uranylacetat und Bleicitrat kontrastiert und bei Vergrößerungen von 15000-50000 untersucht.

Die elektronenmikroskopische Reinheitsprüfung zeigt eine Vesikelfraktion, in der etwa 20 % Membranfragmente, aber keine Verunreinigungen durch Myelin festzustellen

sind (Abb. 1).

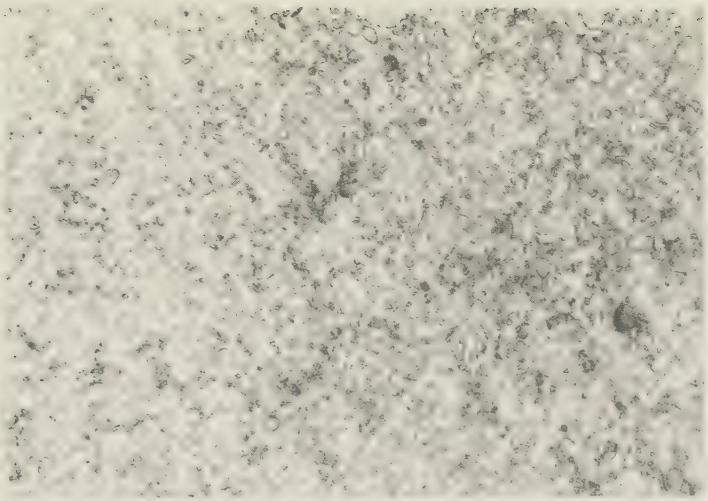

Abb. 1. Elektronenmikroskopische Aufnahme einer Präparation synaptischer Vesikel nach Filtration durch Membranfilter (Isolierungsmethode s. S. 89). X 40000. (Positivkontrastierung)

Da gerade bei Verwendung des myelinreichen Rinderhirns eine Verunreinigung durch Myelin sehr leicht auftreten kann, spricht dieses Ergebnis für das eingesetzte Präparationsverfahren. Abb. 2 zeigt, daß mit der Einführung der fraktionierten Filtration durch Membranfilter der Anteil an großen Membranfragmenten (>1000 Å) stark oder sogar ganz zurückgeht (vgl. Abb. 1). Die Verwendung von Filtern noch kleinerer Porengröße ist jedoch nicht zu empfehlen, da

hierdurch die Ausbeute an Vesikelprotein erheblich zurückgeht, ohne daß die Reinheit der Vesikelfraktion in gleichem Maße zunimmt.

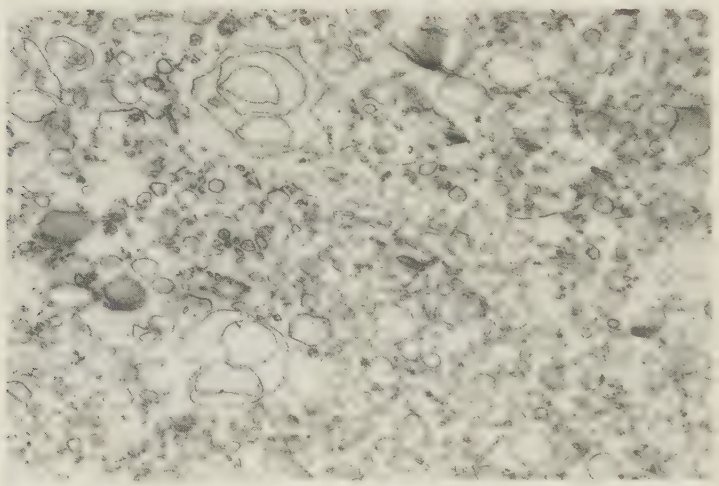

Abb. 2. Elektronenmikroskopische Aufnahme einer Präparation synaptischer Vesikel vor Filtration durch Membranfilter. X 40000. (Positivkontrastierung)

Die mit der oben beschriebenen Methode isolierten synaptischen Vesikel sind nach diesen Ergebnissen für die Untersuchung und Charakterisierung ihrer Membranproteine gut zu verwenden.

2.2.3. Untersuchung der Aminosäuren

Das Vorkommen der Aminosäuren im Nervengewebe wird seit einigen Jahren mit wachsendem Interesse untersucht (32, 33), weil Aminosäuren nicht nur wichtige Funktionen im Stoffwechsel erfüllen, sondern auch als Neurotransmitter wirken können (34-36). Als mögliche Neurotransmitter wurden Glutamat, Aspartat und vor allem γ-Aminobuttersäure (GABA) untersucht und weitgehend anerkannt (32). Auch Glycin wurde als möglicher Transmitter, bis jetzt aber nur im Rückenmark, identifiziert (32). Ob weitere Aminosäuren als Neurotransmitter fungieren, ist noch weitgehend ungeklärt. Es gibt Hinweise, daß auch Alanin, Taurin, Serin und einige andere Aminosäuren bei der Nervenreizleitung mitwirken (32).

Durch die Einführung der Mikrobestimmung von Aminosäuren (37) ist es möglich, Aminosäuren auch im pico-Mol-Bereich (10^{-12}Mol) zu bestimmen. Nach BRIEL u. NEUHOFF (38) werden die Aminosäuren durch Umsetzung mit Dansylchlorid als fluoreszierende Dansylderivate auf Polyamidplatten ($3 \cdot 3\,cm^2$) dünnschichtchromatographisch getrennt und identifiziert.

Mit Hilfe dieser Methode wurden die Aminosäuren des Rindercortex und der daraus isolierten synaptischen Vesikel untersucht. Außerdem wurde auch eine Probe der synaptosomalen Fraktion analysiert. Zur Dokumentation wurden von den

Chromatogrammen Autoradiogramme hergestellt (39). Abb. 3 zeigt die Ergebnisse dieser Untersuchungen.

Durch Zumischversuche mit Glycin konnte gezeigt werden, daß die Hauptkomponente der Dansylaminosäurenderivate der synaptischen Vesikel den gleichen Rf-Wert wie Glycin hat. Das Vorkommen von Glycin wurde außerdem durch Analyse des unhydrolysierten Materials im Aminosäurenanalysator bestätigt. Nach Zusatz von ^{3}H-Glycin zu dem Homogenat des Gesamtcortex war in der daraus gewonnenen Vesikelfraktion kein ^{3}H-Glycin nachzuweisen. Dies spricht dafür, daß das Vorkommen von Glycin in der Vesikelpräparation nicht auf eine unspezifische Bindung des bei der Homogenisation freigesetzten Glycins zurückzuführen ist. Im Gesamtcortex (Abb. 3a) sind neben vielen Aminosäuren geringerer Konzentration besonders Lysin, Leucin, Valin, Glycin, Glutaminsäure und Asparaginsäure stark vertreten. In der synaptosomalen Anreicherung (Abb. 3b) ist vor allem das Vorkommen von GABA, Glycin, Glutaminsäure und Asparaginsäure auffällig; diese vier Aminosäuren gelten alle als potentielle Transmittersubstanzen (32).

Über eine mögliche Transmitterrolle der hier gefundenen Aminosäuren läßt sich aufgrund dieser Versuche keine Aussage machen. Der Nachweis von Glycin in den synaptischen Vesikeln ist deshalb sehr interessant, weil Glycin als Neurotransmitter angesehen wird und dieser Befund zu vielen Spekulationen Anlaß geben kann.

a) Rindercortex

b) synaptosomale Fraktion

c) synaptische Vesikel

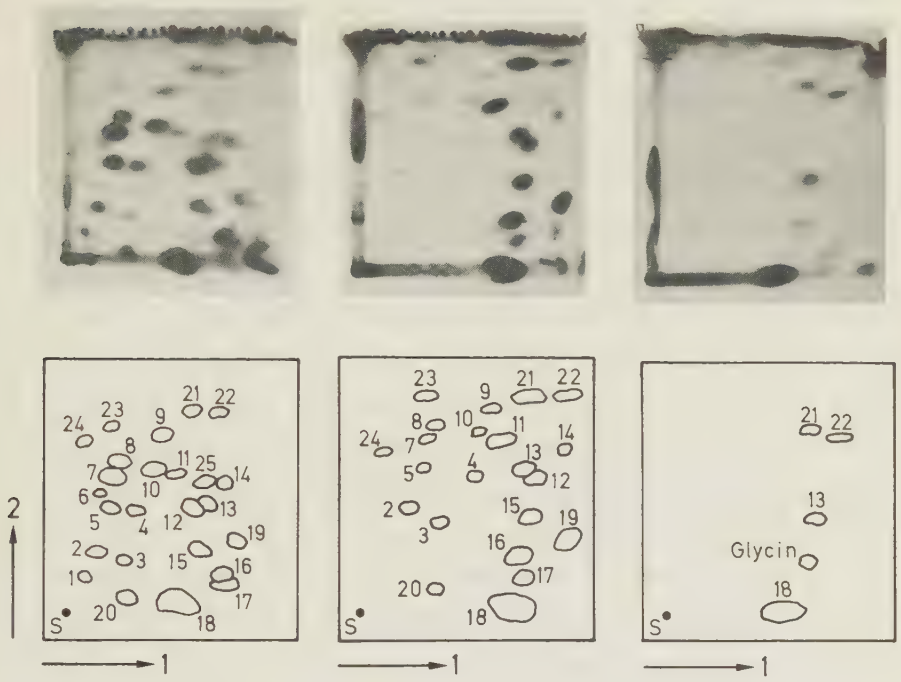

Abb. 3. Autoradiogramme der Dansylaminosäurenderivate

1 Tryptophan, 2 Lysin, 3 Ornithin, 4 Methionin, 5 Phenylalanin, 6 Histidin, 7 Leucin, 8 Isoleucin, 9 Prolin, 10 Valin, 11 GABA, 12 Alanin, 13 Dans-NH_2, 14 Äthanolamin, 15 Glycin, 16 Glutaminsäure, 17 Asparaginsäure, 18 Dans-OH, 19 Glutamin, 20 Taurin, 21 u. 22 Dansylchlorid-Verunreinigungen, 23-25 unbekannte Substanzen.

Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit sollte lediglich gezeigt werden, daß das Aminosäurenmuster im Laufe der subzellulären Fraktionierung eine wesentliche Vereinfachung erfährt und somit zur Charakterisierung von Fraktionen herangezogen werden kann. Zur Klärung der Frage, ob Glycin tatsächlich als Neurotransmitter in den synaptischen Vesikeln enthalten ist, müssen weitere Experimente durchgeführt werden. Hierbei könnten vor allem Bindungsstudien der Aminosäuren an die Vesikel, wie sie von vielen Autoren an Synaptosomen durchgeführt wurden (40-42), Aufschluß geben.

2.3. Charakterisierung der Membranproteine synaptischer Vesikel mit Hilfe von Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Vorliegende Befunde sprechen dafür, daß Membranen des Nervensystems eine begrenzte Anzahl definierter Proteinkomponenten enthalten (43, 44). Je reiner eine Membranfraktion ist, desto einfacher erscheint das Profil der Proteinbanden nach elektrophoretischer Trennung. Aus diesem Grunde wurden viele Präparationen der synaptischen Vesikel jeweils durch Gelelektrophorese untersucht (s. auch S. 43). Ganz allgemein kann gesagt werden, daß mit zunehmender Verbesserung der Methode nicht nur die enzymatisch und elektronenmikroskopisch nachgewiesenen verunreinigenden Komponenten abnahmen, sondern daß damit auch eine Vereinfachung des elektrophoretischen Trennbildes einherging.

2.3.1. Trennung der Vesikelproteine im diskontinuierlichen Tris/Cl-Tris/Glycin-Puffersystem

Zur eindeutigen Zuordnung der Proteinbanden wurden während der Isolierung Proben genommen und elektrophoretisch analysiert. Beim Vergleich des Totalhomogenats als Ausgangsmaterial mit den Zwischenprodukten und den Vesikelpräparationen als Endprodukt ist eine zunehmende Vereinfachung des Trennbildes festzustellen (Abb. 4). Bei allen Vesikelpräparationen wurden stets drei Hauptbanden gefunden. Von den 47 durchgeführten subzellulären Fraktionierungen wurden etwa 30 elektrophoretisch untersucht. Hierbei ergab sich, daß vor allem die langsam und die schnell wandernden Banden nicht immer reproduzierbar auftraten. Einerseits deutet dieser Befund auf unterschiedliche Verunreinigung der Präparate hin, was sich auch in den schwankenden Proteinausbeuten ausdrückt (2-4 mg nach der hier beschriebenen Methode; bis zu 10 mg bei der Methode nach WHITTAKER et al., 18). Andererseits konnte beobachtet werden, daß bei längerem Stehenlassen der Proben in SDS (Natriumdodecylsulfat) eine Vermehrung der Bandenzahl auftrat. Es ist daher empfehlenswert, die Probe sofort der SDS-Elektrophorese zu unterwerfen, um so eine weitergehende Proteolyse zu vermeiden (45).

Die Membranproteine der synaptischen Vesikel wurden sowohl unreduziert als auch nach Reduktion mit 2-Mercapto-

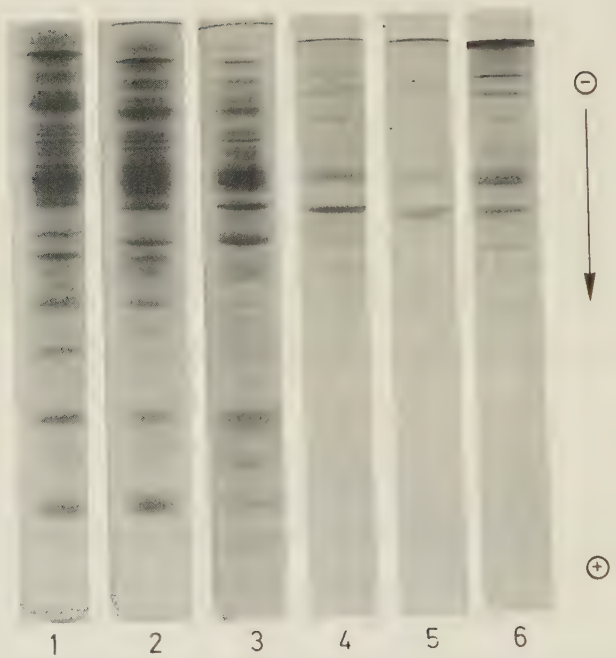

Abb. 4. Gelelektrophorese im diskontinuierlichen SDS-Puffersystem (Färbung der Proteine mit Coomassie-Blau).
Vgl. Isolierungsschema auf Seiten 90 u. 91.

1 Totalhomogenat,
2 ÜS I,
3 ÜS II,
4 ÜSO I,
5 ÜSO II,
6 synaptische Vesikel.

äthanol elektrophoretisch getrennt (Erklärung der gewählten Behandlung und Trennmethode s. S. 58). Zur Aufrechterhaltung des reduzierten Zustandes wurde 2-Mercaptoäthanol dem kathodischen Puffer zugesetzt. Eine andere Probe wurde durch Carboxymethylierung stabilisiert.

Zur Molekulargewichtsbestimmung der Proteinbanden der synaptischen Vesikel wurden Markerproteine zugemischt (Transferrin MG 90000; Ovalbumin MG 45000; Cytochrom c MG 12100) und die Molekulargewichte der unbekannten Proteine nach Bestimmung ihrer relativen Laufstrecke graphisch ermittelt (Abb. 5), eine Methode, die bei SDS-Gelektrophorese verwendet wird (46). In allen Fällen wurden Gele verwendet, die mit einem 3%igen Sammelgel überschichtet sind, da sonst eine Verschiebung des Trennbildes auftritt (Abb. 6/5, s. auch S. 72).

Das Trennbild der nicht reduzierten Probe der synaptischen Vesikel weist etwa 6 Hauptbanden und 14 Nebenbanden auf (Abb. 6/1). Nach Reduktion mit 2-Mercaptoäthanol ist eine geringe Veränderung des Trennbildes zu beobachten (Abb. 6/3). Vor allem im höhermolekularen Bereich sind einige langsam wandernde Banden vermindert bei gleichzeitiger Verstärkung der Hauptbanden I und II und einiger niedermolekularer Banden. Im ganzen ist aber keine erhebliche Veränderung des Proteinmusters eingetreten.

Dagegen erscheint das Bandenbild der reduzierten und anschließend carboxymethylierten Probe einfacher (Abb. 6/6).

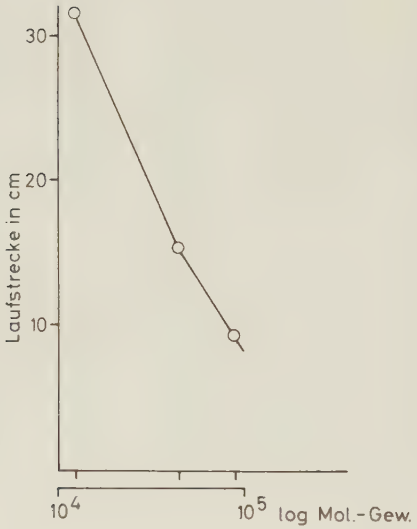

Abb. 5. Molekulargewichtsdiagramm.

Zur Bestimmung der Molekulargewichte wurden zugemischt: Transferrin (MG 90000), Ovalbumin (MG 45000) und Cytochrom c (MG 12100). Die Laufstrecke (1:5 vergrößert) wurde aus den Densitogrammen der mit Coomassie-Blau gefärbten Gele ermittelt.

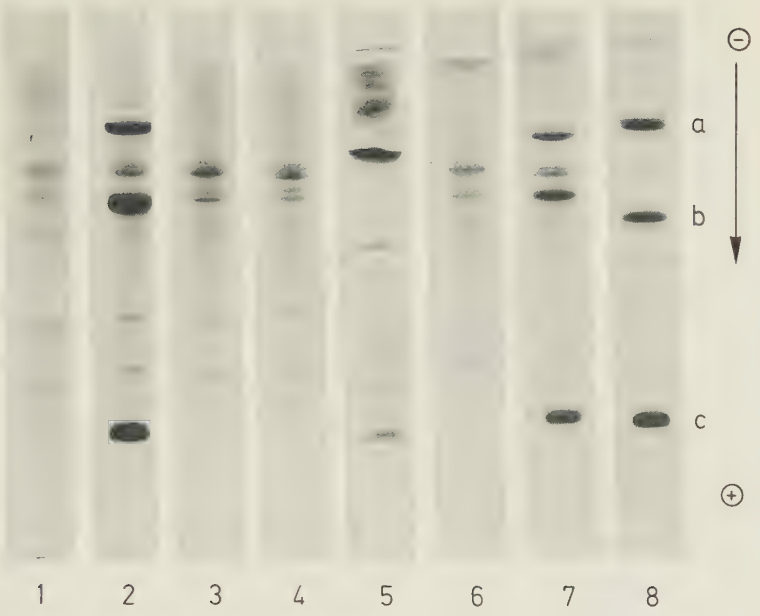

Abb. 6. Gelelektrophorese synaptischer Vesikel im diskontinuierlichen SDS-Puffersystem (Färbung der Proteine mit Coomassie-Blau).

1 synaptische Vesikel, Trennung im Standardpuffersystem;
2 Probe wie 1, Markerproteine zugemischt;
3 Probe wie 1, reduziert mit 1 % Mercaptoäthanol;
4 Probe wie 3, zusätzlich 0,1 % Mercaptoäthanol im Puffer;
5 Probe und Puffer wie 4, ohne Sammelgel;
6 synaptische Vesikel, reduziert und carboxymethyliert;
7 Probe wie 6, Markerproteine zugemischt;
8 Markerproteine allein (a Transferrin, b Ovalbumin, c Cytochrom c).

Gele: 12 % Polyacrylamid, überschichtet mit einem 3%igen Sammelgel.

Es liegen drei Hauptbanden mit Molekulargewichten oberhalb von 30000 und eine niedermolekulare Bande von etwa 17000 vor (vgl. Tab. 2). Die Molekulargewichte der zahlreichen schwächeren Banden liegen im Bereich von 14000-170000.

Tabelle 2.

Membranproteine der Vesikel			Membranproteine der SV nach Reduktion	
Nr.	Molekular-gewicht	Anteil (%), bezogen auf Gesamtprot.	Molekular-gewicht	Anteil (%), bezogen auf Gesamt-proteingehalt
1 2 3 4 5 6	170 000 160 000 155 000 145 000 132 000 115 000	18.0 %		7.8 %
7	109 000	6.0 %	110 000	3.2 %
8	96 000	5.9 %	93 000	3.8 %
9	79 000	7.5 %	82 000	3.9 %
10	67 000	5.0 %	-	-
I	60 000	13.4 %	60 000	19.8 %
11 II 12	49 000 45 000 42 000	12.9 %	49 000 45 000 42 000	16.9 %
13 III	39 000 38 000	9.1 %	39 000 38 000	12.2 %
14 15 16	34 000 33 000 29 000	9.2 %	33 000 29 000 27 000	18,0 %
17	23 000	7.9 %	-	-
18	19 500	1.0 %	-	-
19	17 500	3.7 %	17 500	10.1 %
20	14 500	1.5 %	14 500.	4.0 %

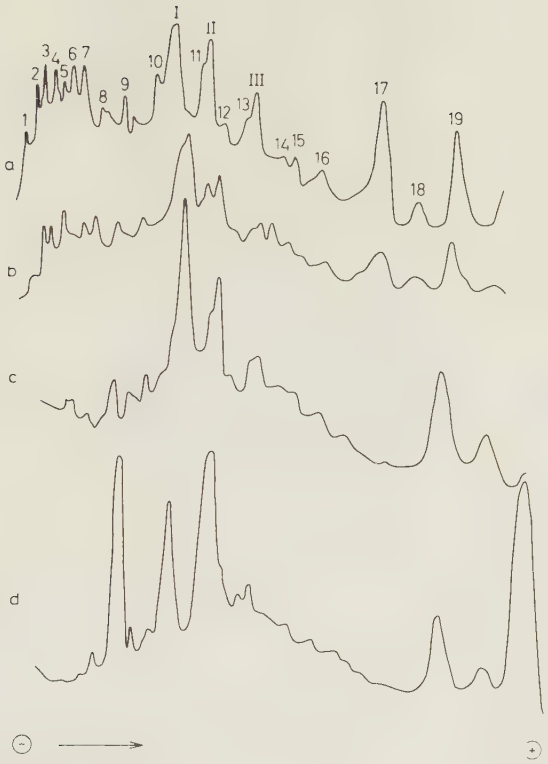

Abb. 7. Densitogramme der Trennungen im diskontinuierlichen Puffersystem (Färbung Coomassie-Blau).

a synaptische Vesikel im Standardpuffersystem;
b synaptische Vesikel, reduziert mit 1 % Mercaptoäthanol;
c synaptische Vesikel, reduziert wie bei b, anschließend carboxymethyliert und dialysiert;
d synaptische Vesikel wie c, Markerproteine zugemischt.

Die Ergebnisse der Molekulargewichtsbestimmungen sind in Tab. 2 zusammengefaßt. Nach WEBER u. OSBORN (47) können Molekulargewichte von Polypeptiden mit einer Genauigkeit von ±10 % bestimmt werden. Die relative Laufstrecke der Proteine wurde aus den Densitogrammen ermittelt (Abb. 7). Zur quantitativen Bestimmung der einzelnen Proteine im Vergleich zum Gesamtproteingehalt wurden diese Pherogramme planimetriert (s. Tab. 2).

Die Werte von Tab. 2 zeigen deutlich, daß nach Reduktion mit 2-Mercaptoäthanol eine Abnahme der höhermolekularen Proteinbanden zugunsten der niedermolekularen erfolgt ist. Dies läßt den Schluß zu, daß die Membranproteine der synaptischen Vesikel auch Proteine mit Disulfidbrücken enthalten. Das Verschwinden der Banden 17 und 18 zeigt, daß diese Banden nicht durch Myelinverunreinigungen aufgetreten sind, wie man aus Mischungsversuchen zunächst schließen könnte (Abb. 8); denn die Proteinbanden des Myelins sind nicht reduzierbar.

Zum Vergleich wurden nach der Methode von MORGAN et al. (25) synaptische Vesikel aus Rinderhirn isoliert und außerdem nach der auf S. 89 beschriebenen eigenen Methode Vesikel aus Rattenhirn hergestellt. Abb. 9 zeigt die elektrophoretischen Trennbilder dieser Präparationen und einer Präparation synaptischer Vesikel aus Rattenhirn, die von MORGAN zur Verfügung gestellt wurde.

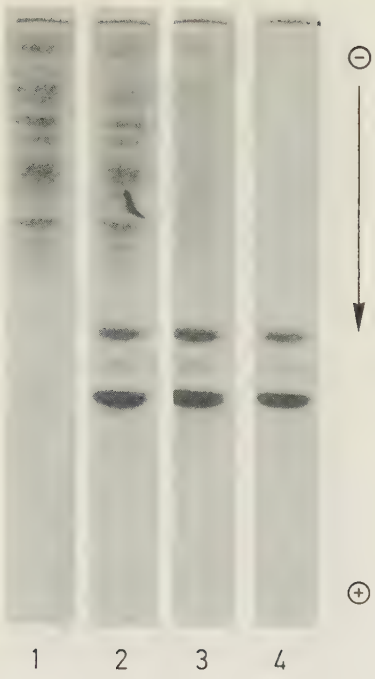

Abb. 8. Vergleichende Elektrophorese von Proteinen synaptischer Vesikel mit denen des Rindermyelins.

1 synaptische Vesikel;
2 und 3 synaptische Vesikel, gemischt mit unterschiedlichen Mengen von Myelinprotein;
4 Rindermyelin.

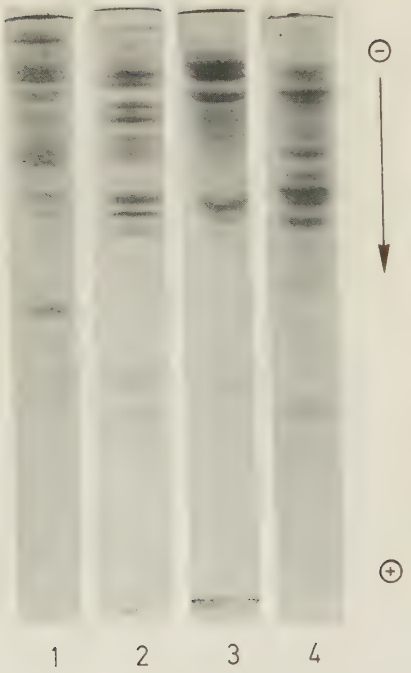

Abb. 9. Elektrophorese im diskontinuierlichen Puffersystem (Färbung Coomassie-Blau).

1 synaptische Vesikel aus Rinderhirn, nach der hier beschriebenen Methode isoliert;
2 synaptische Vesikel aus Rinderhirn, nach der Methode von MORGAN et al. (25) isoliert;
3 synaptische Vesikel aus Rattenhirn, nach der hier beschriebenen Methode isoliert;
4 synaptische Vesikel aus Rattenhirn, nach der Methode von MORGAN et al. (25) isoliert.

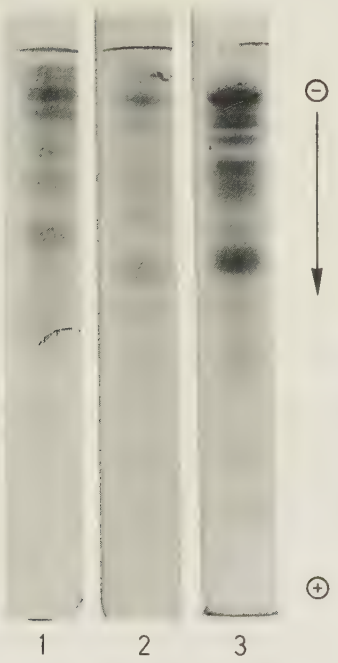

Abb. 10. Elektrophorese im kontinuierlichen SDS-Phosphatpuffersystem (Gele 10 %; Färbung Coomassie-Blau)

1 synaptische Vesikel aus Rinderhirn, nach der hier beschriebenen Methode isoliert;

2 synaptische Vesikel aus Rinderhirn, nach der Methode von MORGAN et al. (25) isoliert;

3 synaptische Vesikel aus Rattenhirn, nach der hier beschriebenen Methode isoliert.

Die Proteinprofile der aus Ratten- und Rinderhirn isolierten synaptischen Vesikel weisen nur geringfügige Unterschiede auf (s. auch Abb. 10). Zusätzlich zeigen die Trennungen, daß mit der hier beschriebenen vereinfachten Methode Präparationen erhalten werden können, die mit denen von MORGAN et al. (25) vergleichbar sind.

2.3.2. Trennung der Vesikelproteine im kontinuierlichen Phosphatpuffersystem

Die Membranproteine der synaptischen Vesikel wurden zur Kontrolle und zum besseren Vergleich mit den Ergebnissen der Literatur auch im kontinuierlichen Puffersystem getrennt (Abb. 10). Lange Trennzeiten und schlechte Konzentrierungseffekte zu Beginn der Elektrophorese (s. S. 48) bewirken, daß das Trennbild einfacher erscheint; die beschriebenen Hauptbanden sind jedoch in beiden Systemen zu erkennen.

2.3.3. Glykoproteine der synaptischen Vesikel

Glykoproteine als Bestandteile von Zelloberflächen spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation des Zellwachstums, bei Antigen-Antikörper-Wechselwirkungen und bei Erkennungsmechanismen von Zellen untereinander. Das Vorkommen von Glykoproteinen im Nervengewebe gab Anlaß, über spezielle neuronale Funktionen zu spekulieren, denn Glyko-

proteine befinden sich an Kontaktstellen der Neurone, besonders in der synaptischen Region (22, 48). Sie konnten von mehreren Autoren eindeutig in synaptosomalen Plasmamembranen nachgewiesen werden. BRECKENRIDGE u. MORGAN (49) konnten zeigen, daß einige Glykoproteinkomponenten der synaptischen Vesikelmembranen und der synaptosomalen Plasmamembranen in der Elektrophorese identische Wanderungsgeschwindigkeiten aufweisen. Dieser Befund wurde durch Mischungsexperimente bestätigt. Es ist ungewiß, ob diese Glykoproteinkomponenten in beiden Membranen identische oder unterschiedliche Funktionen ausüben. Die Gemeinsamkeit der Proteinzusammensetzung läßt aber einen Zusammenhang mit dem Exocytose-Prozeß der synaptischen Vesikel vermuten. Es wird postuliert, daß die Vesikel bei der Ausschüttung der Neurotransmitter mit der präsynaptischen Plasmamembran durch Exocytose fusionieren, um nach einer Verweilzeit wieder abgelöst zu werden (21). Dieser Exocytose-Pinocytose-Mechanismus der synaptischen Vesikel ist noch nicht gesichert, im Gegensatz zu zahlreichen anderen Geweben, wo er als der sekretorische Mechanismus gilt (21). Differenzen bei den Untersuchungen der synaptischen Vesikel ergaben sich vor allem aus den verschiedenen Reinheitsgraden der verwendeten Präparationen (17, 21).

Zur Untersuchung der Glykoproteine wurden die Gele nach der elektrophoretischen Trennung mit Perjodsäure und Schiff' Reagenz nach ZACHARIUS et al. (49) behandelt.

Nach dieser Färbung sind im Trennbild des Totalhomogenats etwa 5 Glykoproteine mit Molekulargewichten über 100 000 und zwei mit Molekulargewichten unter 100 000 zu erkennen. Dagegen erscheint das Trennbild der synaptischen Vesikel etwas vereinfacht (Abb. 11). Neben zwei Hauptbanden, die gleich schnell wie die niedermolekularen Banden des Totalhomogenats wandern, ist im oberen Drittel des Gels eine weitere Bande sichtbar, bei der es sich wahrscheinlich um eine Doppelbande handelt.

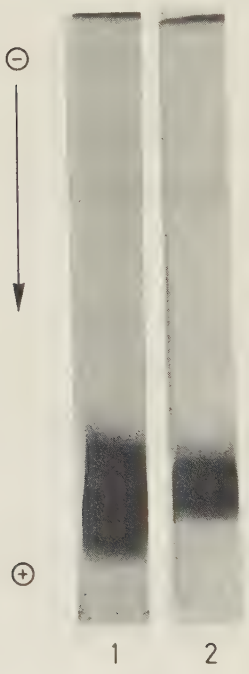

Abb. 11.

Trennung der Glykoproteine auf SDS-Gelen (Färbung mit Perjodsäure-Schiff' Reagenz)

1 Totalhomogenat des Rinderhirns;
2 synaptische Vesikel.

2.3.4. Triton-Extraktion der Membranproteine synaptischer Vesikel

Das nichtionische Detergenz Triton X-100 ist schon in geringer Konzentration ein gutes Mittel, um wasserunlösliche Membranproteine zu extrahieren (51). Da es selektiv Glykoproteine aus Membranen des Nervensystems herauslöst, wurde es zur weiteren Charakterisierung der Vesikelproteine eingesetzt. Nach BRUNNGRÄBER (52) werden etwa 60 % der unlöslichen Glykoproteine eines Gesamthirnextraktes durch eine 0.5%ige Triton-X-100-Lösung extrahiert. Der Kohlenhydratanteil eines solchen Extraktes beträgt etwa 3.2 %. Aus den Glykoproteinen entstehen durch Proteolyse Glykopeptide mit Molekulargewichten zwischen etwa 9900 und 135 000. Diese enthalten als monomere Kohlenhydrate Fucose, N-Acetylneuraminsäure, Galactose, Mannose, Glucosamin und Galactosamin (52).

Die Behandlung der Membranproteine mit Triton ist insofern unbefriedigend, als Triton die Agglomeration der Proteine fördert. Dieser Effekt wird durch hydrophobe Wechselwirkungen noch verstärkt (17). Die Neigung zur Bildung von Agglomeraten läßt sich aus dem nichtionischen Charakter des Lösungsmittels und seiner sehr niedrigen kritischen Mizellkonzentration erklären. Die kritische Mizellkonzentration liegt bei etwa 0.01 %. In einem solchen Extrakt sind nach elektrophoretischer Trennung nur eine geringe

Anzahl langsam wandernder, hochmolekularer Banden erkennbar. Durch Dialyse gegen SDS können die Tritonmizellen zerstört werden. Statt dessen wird SDS an die monomolekular vorliegenden Proteine gebunden, die dann im SDS-Puffersystem elektrophoretisch getrennt werden können (53, 54).

Bei der Behandlung des Totalhomogenats mit Triton gingen etwa 65 % der Gesamtproteine in Lösung, wogegen bei der Extraktion der Vesikelproteine nur 35 % erfaßt wurden. Diese in Triton löslichen Proteine wurden nach Dialyse gegen SDS im diskontinuierlichen SDS-Puffersystem analysiert. Der in Triton unlösliche Rückstand wurde in SDS aufgenommen und ebenfalls im SDS-System elektrophoretisch getrennt.

Das Bandenbild der mit Triton extrahierbaren Vesikelproteine weist eine Hauptproteinbande und etwa 5 schwächere Nebenbanden auf (Abb. 12). Auffällig ist wieder die schnell wandernde Bande im anodischen Gelbereich. Diese Bande läuft deckungsgleich mit dem basischen Protein des Rindermyelins. Bei der Durchführung einer Triton-Extraktion von Rindermyelin konnte aber gezeigt werden, daß das basische Protein des Rindermyelins nicht mit Triton extrahierbar ist. Diese niedermolekulare Bande ist daher, wie schon oben gezeigt werden konnte, als vesikelspezifisch zu betrachten.

Beim Vergleich der Trennergebnisse des Tritonextraktes der Vesikel mit denen des Rückstandes der Tritonextraktion und den Gesamtproteinen der Vesikel ist erkennbar, welche

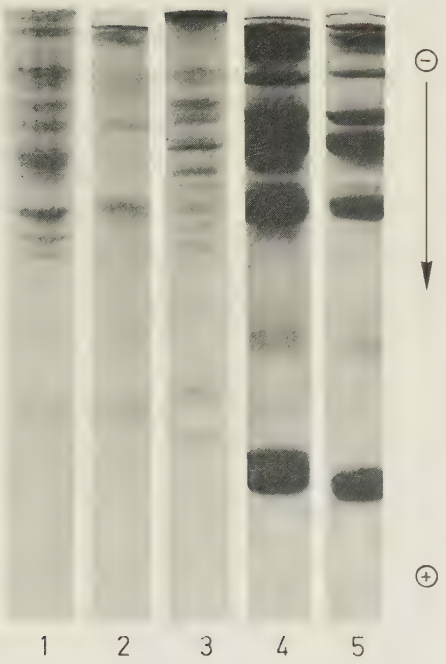

Abb. 12. Fraktionierung des Tritonextraktes (Färbung mit Coomassie-Blau).

1 synaptische Vesikel;
2 Tritonextrakt der synaptischen Vesikel;
3 Rückstand der Tritonextraktion;
4 Tritonextrakt, gemischt mit Markerproteinen;
5 Markerproteine: Cytochrom c, Ovalbumin, Humanalbumin und Conalbumin.

Proteine durch Triton extrahiert wurden. Im Pherogramm des in SDS gelösten Tritonrückstandes (Abb. 13) ist eine deutliche Abnahme der Hauptbande II festzustellen.

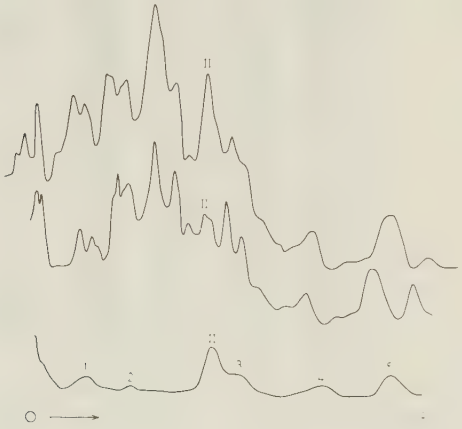

Abb. 13. Densitometerkurven nach Tritonextraktion der synaptischen Vesikel.

Oben: Ergebnis der Trennung der Gesamtvesikelproteine;
Unten: Trennung des Rückstandes der Tritonextraktion;
Mitte: Trennung des Tritonextraktes

(Gele: 12 %; Färbung mit Coomassie-Blau)

Bei den mit Triton extrahierten Proteinen, die als Nebenbanden bezeichnet wurden, ist die Abnahme der Banden weniger deutlich. Die Tritonextraktion erlaubt, die Hauptbande II selektiv von den Gesamtproteinen zu trennen.

Im folgenden soll versucht werden, die Hauptbande des Tritonextraktes näher zu charakterisieren.

Zunächst wurden auch hier durch Zumischversuche mit bekannten Markerproteinen die Molekulargewichte der Haupt- und Nebenbanden bestimmt. Als Markerproteine wurden verwendet: Cytochrom c (MG 12100), Ovalbumin (MG 45000), Humanalbumin (MG 69000) und Conalbumin (MG 77000-80000). Die Ergebnisse der Molekulargewichtsbestimmungen sind aus Tab. 3 ersichtlich.

Tabelle 3.

Nr. der Bande	Proteine des Tritonextraktes Molekulargewicht	Glykoproteine Molekular-gewicht
1	95000	95000
2	78000	78000
II	45000	45000
3	42000	
4	27000	
5	17500	

vgl. auch Abb. 13

Außerdem wurde der prozentuale Anteil der Hauptbande II, bezogen auf den Gesamtproteingehalt, in den drei untersuchten Fraktionen bestimmt. Hiernach ist der Anteil der Hauptbande II am Gesamtproteingehalt im Tritonextrakt am größten:

Anteil der Hauptbande II	in Fraktion
10 - 12 %	Gesamtproteine der synaptischen Vesikel
4.5 %	Rückstand der Tritonextraktion
24 - 25 %	Tritonextrakt

Durch Anfärbung auf Glykoproteine konnte gezeigt werden, daß es sich bei der Hauptbande des Tritonextraktes um ein Glykoprotein handelt. Außerdem wurden noch zwei höhermolekulare Banden angefärbt (s. Tab. 3).
Diese Banden entsprechen wahrscheinlich den Banden 8, 9, II, 12, 16 und 19 der Trennung der Gesamtproteine der Vesikel (vgl. Tab. 2, Seite 26). Reduktionsversuche führten zu keiner Veränderung des Bandenbildes.

2.3.5. Charakterisierung des Hauptproteins des Tritonextraktes

2.3.5.1. Auf Mikrogelen

Um mit Sicherheit nachweisen zu können, daß es sich bei der Hauptbande des Tritonextraktes um eine einzige Proteinbande handelt und nicht um eine Agglomeration aus mehreren, wurde diese Bande aus dem Gel isoliert und erneut auf Mikrogradientengelen (55) fraktioniert. Das Trennbild ergab eine scharfe Bande (Abb. 14). Durch Zumischversuche mit Markerproteinen konnte auch in diesem

System das Molekulargewicht von 45000 bestätigt werden.

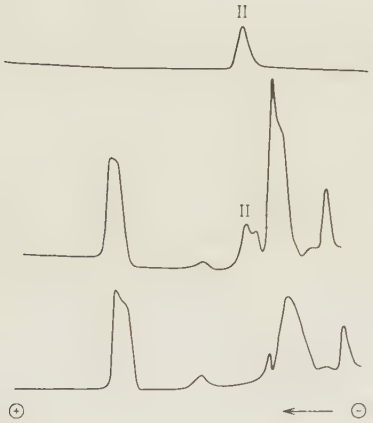

Abb. 14.

Oben: Hauptbande II des Tritonextraktes
Mitte: Mischung der Hauptbande mit Cytochrom c und Humanalbumin
Unten: Cytochrom c und Humanalbumin
(Färbung der Gele mit Coomassie-Blau).

2.3.5.2. Qualitative Bestimmung der Aminosäurenzusammensetzung der Hauptbande

Die Hauptbande II wurde zur Aminosäurenbestimmung ebenfalls aus den Gelen eluiert und nach Hydrolyse im

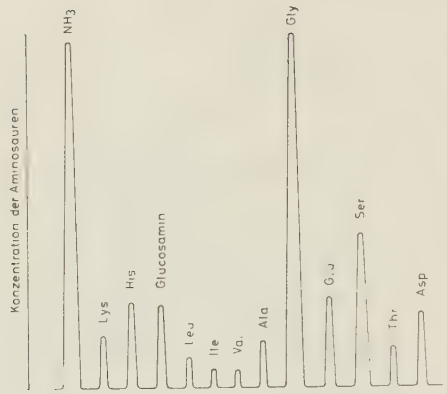

Abb. 15. Elutionsdiagramm der Trennung der Aminosäuren der Hauptbande II.

Beckman Aminosäurenanalysator untersucht. Im Hydrolysat des Proteins konnten Lysin, Alanin, Valin, Isoleucin und Leucin in geringen Konzentrationen nachgewiesen werden. Histidin, Asparaginsäure, Threonin, Glutaminsäure und vor allem Serin waren in größeren Konzentrationen vorhanden. Zusätzlich konnte Glucosamin nachgewiesen werden, was die Ergebnisse der PAS-Färbung bestätigt. Damit wurde bewiesen, daß es sich bei der Hauptbande II des Tritonextraktes um ein G l y k o p r o t e i n handelt. Außerdem sprechen

diese Befunde für ein saures, nicht reduzierbares Protein, da der Anteil an sauren Aminosäuren (Glutaminsäure und Asparaginsäure) im Gegensatz zu dem Anteil an den basischen Aminosäuren (Lysin, Arginin und Histidin), von denen nur Histidin nennenswert vertreten ist, relativ hoch ist. Das Verhältnis der basischen zu den sauren Aminosäuren beträgt etwa 1:3. Aminosäuren mit SH-Gruppen sind in dem Hauptprotein nicht vorhanden.

2.4. SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese zur Charakterisierung von Membranproteinen

Zur Charakterisierung membrangebundener Proteine hat sich die elektrophoretische Fraktionierung an Gelen aus Polyacrylamid nach vorheriger Beladung der Proteine mit dem anionischen Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) als wirksame analytische Methode bewährt (54, 56, 57). Die Verwendung von SDS hat viele Vorteile:

1. Die mit Lipiden komplexierten Membran-Proteine werden durch Komplexbildung mit SDS wasserlöslich;
2. die durch SDS-Beladung entstandenen SDS-Proteinkomplexe sind stark negativ geladen und verhalten sich wie Anionen von guter Beweglichkeit;
3. da alle Komplexe anionisch vorliegen, kann die Elektrophorese weitgehend pH-unabhängig durchgeführt werden;
4. SDS-Gelelektrophorese dient nicht nur zur Identifizie-

rung und Charakterisierung von Proteinen, sondern kann auch zur Bestimmung ihrer Molekulargewichte herangezogen werden (45, 46, 47).

Die Anwendung der SDS-Gelelektrophorese auf den speziellen Fall der Proteine der synaptischen Vesikel ergab ein komplexes Bandenbild. Dabei war jedoch nicht klar, ob diese Vielfalt von Banden wirklich vorhandene Vesikelproteine anzeigte oder ob die eingesetzte elektrophoretische Trennmethode durch Artefaktbildungen (wie z.B. Reaggregationen bei SH-haltigen Proteinen) das Auftreten einer größeren Bandenzahl verursachte. Eine Möglichkeit zur Verminderung der Bandenzahl nach Disulfidbrückenbildung besteht in der Vorbehandlung der Proteine mit reduzierenden Agenzien. Hierbei werden Disulfidbrücken gespalten, und es kann eine Verringerung der Bandenzahl, vor allem im höhermolekularen Bereich, auftreten. Diese Art der Vorbehandlung ist zur einwandfreien Molekulargewichtsbestimmung mit der SDS-Gelelektrophorese in jedem Falle notwendig (58). Die Literaturangaben über eine geeignete reduzierende Proteinbehandlung und über die Elektrophoresebedingungen sind jedoch sehr unterschiedlich (46, 47, 59). Dies führte zu eingehenderen methodischen Untersuchungen der Elektrophorese in kontinuierlichen und diskontinuierlichen SDS-Puffersystemen, deren Ergebnisse im folgenden Abschnitt behandelt werden. Die Untersuchungen wurden im wesentlichen an den

Membranproteinen von Ratten- und Rinderhirn sowie an den Membranproteinen von menschlichen Erythrozyten durchgeführt, da die Vesikelproteine nur mühsam und in kleiner Ausbeute zu erhalten sind.

Zum Verständnis der elektrochemischen und physikalischen Vorgänge, die während einer Gelelektrophorese ablaufen, müssen zunächst einige theoretische Überlegungen vorausgeschickt werden.

2.4.1. Zur Theorie der Elektrophorese

Die Bewegung von Ionen in einem viskosen Medium erfolgt nach zwei Gesetzen, dem Erhaltungssatz für die Ladungsdichte und dem Ohmschen Gesetz (KOHLRAUSCH, 1897; 60). Da die Gelelektrophorese im wesentlichen ein eindimensionales Problem ist, wird im folgenden nur eine räumliche Koordinate x berücksichtigt.

Der Erhaltungssatz besagt, daß Materie nicht verschwindet oder entsteht, d.h., die Ladungsdichte ρ_k einer Ionensorte k kann in einem Bereich nur zunehmen, wenn auf einer Seite mehr einströmt als auf der anderen hinausfließt. Man kann dies formal so ausdrücken, daß die zeitliche Änderung von ρ_k und die räumliche Änderung des zugehörigen Ionenstroms i_k sich überall und jederzeit zu Null addieren müssen:

$$\frac{\partial \rho_k}{\partial t} + \frac{\partial i_k}{\partial x} = 0 \qquad (1)$$

Der Ionenstrom i_k ist definiert als das Produkt aus Ladungsdichte und Geschwindigkeit v_k. Nach dem Ohmschen Gesetz ist die Stromdichte der elektrischen Feldstärke E proportional, wobei die Proportionalitätskonstante als Leitfähigkeit σ_k bezeichnet wird:

$$i_k = \rho_k \, v_k = \sigma_k \cdot E \qquad (2)$$

Statt der Leitfähigkeit wird bei der Elektrophorese häufig lieber die Beweglichkeit (Mobilität) u_k diskutiert, weil diese anschaulicher erscheint. Man vergleicht dabei dann nicht den Strom, sondern die Geschwindigkeit mit der Feldstärke:

$$v_k = u_k \cdot E \qquad (3)$$

Dabei ist zu beachten, daß u_k wie auch ρ_k die Ladung der Ionensorte k als Faktor enthält und demnach beide Vorzeichen annehmen kann.

Wenn die Lösung insgesamt elektrisch neutral ist, was immer gelten soll, dann ist der Gesamtstrom $i = \sum_k i_k$ räumlich konstant. Alle anderen bisher eingeführten Größen können sich dagegen von Ort zu Ort ändern. Für das elek-

trische Feld E und die Gesamtleitfähigkeit $\sigma = \sum_k \sigma_k$ gilt dabei nach (2) der Zusammenhang

$$i = \sigma \cdot E \tag{4}$$

Ist nun z.B. i vorgegeben und der Wert der Mobilitäten u_k bekannt, so kann man aus einer Anfangsverteilung ρ_k (x, o) der verschiedenen Ladungsdichten berechnen, wie diese zu späteren Zeiten aussehen. Dabei soll nur der Fall der verdünnten Lösungen diskutiert werden, für den man konzentrations- und zunächst ortsunabhängige Beweglichkeiten annehmen kann: da die Ionen sich gegenseitig nicht beeinflussen, hängt ihre Mobilität nur von der jeweiligen Sorte und dem Lösungsmittel ab.

Bei der weiteren Erörterung erweist sich eine Größe als hilfreich, von der sich zeigen läßt, daß sie zwar nicht räumlich, aber zeitlich unveränderlich ist. Das ist die sogenannte "beharrliche Funktion" von KOHLRAUSCH (60). Setzt man nämlich nacheinander (2), (3) und (4) in (1) ein, so folgt

$$\frac{\partial \rho_k}{\partial t} = -i \frac{\partial}{\partial x} \cdot \frac{\rho_k \cdot u_k}{\sigma} \tag{5}$$

Da aber u_k nicht von x abhängen soll und $\sum_k \rho_k = 0$ ist wegen der Gesamtneutralität, gilt

$$\frac{\partial}{\partial t} \Sigma \frac{\rho_k}{u_k} = -i \frac{\partial}{\partial x} \frac{\Sigma \rho_k}{\sigma} = 0$$

Es ist also die Funktion

$$F = \sum_k \frac{\rho_k}{u_k} \quad \text{die BEHARRLICHE FUNKTION} \tag{6}$$

an einem gegebenen Ort für alle Zeiten konstant.

Im folgenden interessiert vor allem der Fall, daß ein Kation K und mehrere Anionen A, B ... vorliegen. Die Elektroneutralitätsbedingung lautet dann $\rho_A + \rho_B + \ldots + \rho_K = 0$, so daß für die beharrliche Funktion gilt

$$F = \frac{\rho_A\,(u_K - u_A)}{u_A\,u_K} + \frac{\rho_B\,(u_K - u_B)}{u_B\,u_K} + \cdots$$

Wird nun $F_K = u_K F$ und $n_A = \frac{-u_A}{u_K - u_A}$ etc. (Hittorfsche Überführungszahl) definiert, so kann die beharrliche Funktion aufgefaßt werden als

$$F_K = -\left(\frac{\rho_A}{n_A} + \frac{\rho_B}{n_B} + \ldots\right) \tag{7}.$$

2.4.1.1. Kontinuierliche Elektrophorese

Der Fall zweier Anionen A und B läßt sich nach KOHLRAUSCH allgemein lösen. Sind anfänglich die Konzentrationsverläufe $\rho_A(x)$ und $\rho_B(x)$ gegeben, so kann man sie auch für spätere Zeiten angeben. Für den Spezialfall, daß die Beweglichkeiten u_A und u_B gleich sind, ergibt sich das vernünftige Resultat, daß das Verhältnis ρ_A/ρ_B der beiden Anionenkonzentrationen sich mit einer Geschwindigkeit

$$v = \frac{u_A}{u_K - u_A} \cdot \frac{i}{\rho_A + \rho_B} = u_A \frac{i}{\sigma} = u_A \cdot E \qquad (8)$$

verschiebt. Wenn also $\rho_A + \rho_B$ (und damit auch E) überall denselben Wert hat, dann rückt die ganze Lösung gleichmäßig vor.

Ein Trenneffekt setzt natürlich nur dann ein, wenn die Beweglichkeiten verschieden sind. Von Interesse ist hier der Fall mehrerer Anionen B, C ..., die auf dem Untergrund eines Pufferanions A und eines gemeinsamen Kations K laufen. In erster Näherung ist die Geschwindigkeit der Anionenbanden wieder $u_B E^{(B)}$, $u_C E^{(C)}$ usw., doch ist zu beachten - und durch Klammern angedeutet -, daß jede Bande ihr eigenes Feld E hat. Ist etwa die Leitfähigkeit außerhalb der Banden, also die des Puffers,

$$\sigma_o = \rho_A (u_A - u_K) \qquad (9),$$

so gilt im Inneren der Bande B

$$\sigma = \sigma_o + \rho_B (u_B - u_K) \qquad (10).$$

Bei festem Strom i ist also $E = i/\sigma$ gegenüber dem außerhalb der Bande herrschenden Feld E_o reduziert

$$E = E_o \cdot \frac{\sigma_o}{\sigma} \qquad (11).$$

Diese Reduktion macht sich um so stärker bemerkbar, je größer die Leitfähigkeit der Anionen B, C ... gegenüber derjenigen des Puffers ist.

Die Wanderungsgeschwindigkeit einer Bande hängt somit stark von der Anionenkonzentration ab.

2.4.1.2. Diskontinuierliche Gelelektrophorese

Übersichtlicher werden die Verhältnisse, wenn die Komponenten A, B ... in Schichten angeordnet sind, die mit scharfen Grenzflächen aneinander stoßen. Wie eine solche Anordnung als stabile Situation (steady state stack; 61) entstehen kann, wird weiter unten noch diskutiert. Zunächst kann gezeigt werden, daß die Konstanz der beharrlichen Funktion in der Zeit - nicht im Raum - wichtige Schlußfolgerungen auf die Konzentrationen in einer solchen Schichtenfolge zuläßt.

Betrachtet wird der Fall zweier Anionen A, B und eines gemeinsamen Kations K. Die A-Ionen seien anfänglich links angeordnet, die B-Ionen rechts von einer Stelle x_o (Abb. 16).

Die zeitliche Entwicklung dieser Situation, wenn die Anionen in die positive x-Richtung gezogen werden, ist leicht zu übersehen, sofern der Fortbestand einer scharfen Grenze zwischen A- und B-Ionen zunächst vorausgesetzt wird. Die Leitfähigkeit ist links, wo $\rho_K = -\rho_A$ ist,

$$\sigma_L = \rho_A (u_A - u_K)$$

Rechts von x_o gilt $\rho_K = -\rho_B$ und somit

$$\sigma_R = \rho_B (u_B - u_K).$$

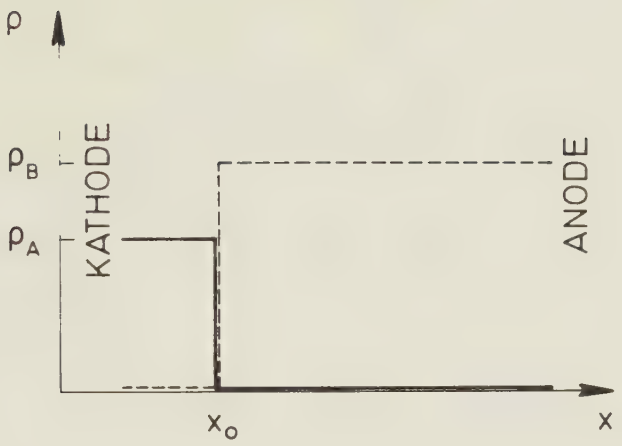

Abb. 16. Ausgangsverteilung der Ladungsdichten für die Anionen A und B.

Die Geschwindigkeiten der beiden Anionensorten sind demnach

$$v_A = u_A E^{(L)} = u_A \cdot \frac{i}{\sigma_L} = - \frac{n_A}{\rho_A} \cdot i \qquad (12a)$$

$$v_B = u_B E^{(R)} = u_B \cdot \frac{i}{\sigma_R} = - \frac{n_B}{\rho_B} \cdot i \qquad (12b)$$

Es ist aber nach (7) die beharrliche Funktion F_K links gerade $-\rho_A/n_A$, rechts $-\rho_B/n_B$. Es verschiebt sich also

die Grenze genau dann mit der Geschwindigkeit $v_A = v_B$, wenn die beharrliche Funktion stetig ist, d.h. rechts und links denselben Wert hat.

Ist dagegen F_K bei x_o unstetig, so muß sie es für alle Zeiten bleiben, denn die beharrliche Funktion kann ja ihren Wert nicht ändern. Es muß sich demnach die Konzentration des A-Anions rechts von x_o so einstellen, daß F_K dort den Wert $-\rho_A/n_A = -\rho_B/n_B$ hat, also

$$\rho_A = \frac{n_A}{n_B}\,\rho_B \qquad (13).$$

War ursprünglich $v_A < v_B$ (s. Abb.17a), so wird ρ_A rechts von x_o kleiner als links sein, damit rechts $v_A = v_B$ gilt. War dagegen $v_A > v_B$ (s. Abb.17b), so wird ρ_A rechts von x_o größer sein als links. In beiden Fällen reguliert also die vorausschreitende Anionensorte B, welche Konzentration die nachfolgende Anionensorte A unmittelbar hinter der wandernden Front hat. Die ursprüngliche Konzentration des A links von der Grenze x_o ist dabei völlig unerheblich.

Nach diesem Überblick über das Verhalten der Anionen unter der Voraussetzung scharfer Grenzen ist zu überlegen, inwieweit diese Voraussetzung gerechtfertigt ist. Dazu wird das Schicksal eines Ions, das zufällig einmal die Grenze überschreitet, betrachtet. Hierbei kann man zwei Fälle unterscheiden.

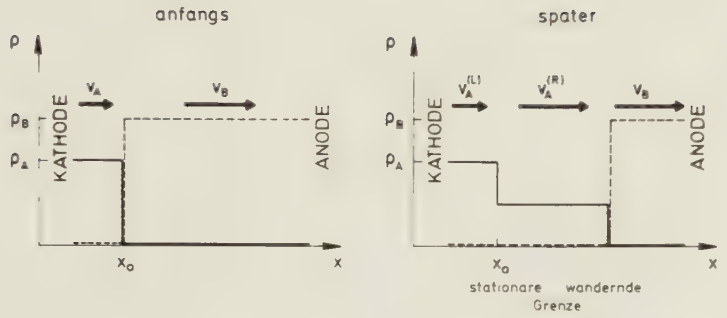

Abb. 17 a. Zeitliche Entwicklung einer Anionenverteilung über gemeinsamem Kation. Das vorlaufende Anion B hat zunächst die größere Geschwindigkeit v_B. Die Konstanz der beharrlichen Funktion erfordert jedoch, daß das Nachlaufion A hinter der mitlaufenden Grenze dieselbe Geschwindigkeit annimmt. Die Dichte ρ_A muß daher am Ort der ursprünglichen Grenze einen Sprung machen.

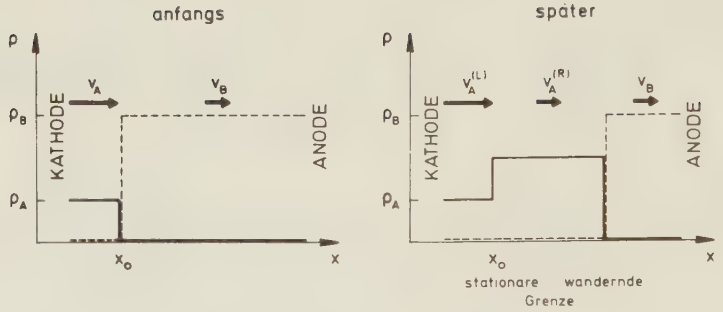

Abb. 17 b. Zeitliche Entwicklung einer Anionenverteilung über gemeinsamem Kation. Das vorlaufende Anion B ist in diesem Falle zunächst langsamer. Das Nachlaufion A wird entsprechend abgebremst, so daß seine Konzentration zwischen der stationären und der mitwandernden Grenze gegenüber der anfänglichen Konzentration erhöht wird. Diese Situation ist stabil, sofern die Beweglichkeit der B-Ionen größer ist als die der A-Ionen.

(i) $|u_A| > |u_B|$

Aus (12) folgt dann, daß die Feldstärke rechts der wandernden Front größer ist als links. Ein Anion A, das zufällig einmal nach rechts hinüber gerät, wird wegen seiner höheren Mobilität schneller zur Anode gezogen als die B-Ionen; es gibt also eine deutliche Tendenz zur Auflösung der Grenzfläche. Dieser Fall ist also instabil.

(ii) $|u_A| < |u_B|$

In diesem Fall ist die Feldstärke links höher als rechts. Ein nach rechts hinüber gewechseltes A-Anion gerät also in ein schwächeres elektrisches Feld und wird abgebremst; es findet dadurch zu seinem Verband zurück. Entsprechend wird ein B-Anion, das zufällig nach links gerät, beschleunigt und gleichfalls wieder seinen Artgenossen zugeführt. Die wandernde Front stellt in diesem Fall einen stabilen Zustand dar.

Allgemein kann man sagen, daß bei unbehinderter Elektrophorese eine scharfe Grenze zwischen dem vorausschreitenden mobileren Anion und dem nachfolgenden schwerfälligeren einen stabilen Endzustand darstellt. Aus der Gleichung (13) für den stationären Zustand ergibt sich schließlich noch, daß $|\rho_B| > |\rho_A|$ sein muß. Die oben unter Abb. 17a und 17b gezeichneten zwei Situationen sind also alle stabil.

Die Anwendung auf den Fall der diskontinuierlichen Diskelektrophorese ist nun nicht mehr schwer. Die beiden

Anionen A und B können als Nachlaufpuffer und Vorlaufpuffer identifiziert werden. Damit zwischen diesen eine stabile Wanderfront bestehen kann, muß der Vorlaufpuffer eine höhere Beweglichkeit und eine höhere Konzentration als der Puffer im Nachlauf aufweisen. Hinzu kommt aber noch ein Gemisch aus Proteinen, die in diesem Fall mit SDS beladen und daher sämtlich anionisch sind. In einem verhältnismäßig großporigen Sammelgel, das die Wanderung der Proteine nicht durch einen Siebeffekt behindert, sind nun für jede Proteinkomponente die obigen Überlegungen anwendbar. Je zwei Komponenten werden sich so anordnen, daß die mobilere rechts vor der weniger mobilen herläuft; die Konzentrationen richten sich dabei nach der beharrlichen Funktion des Vorlaufpuffers. Es kommt auf diese Weise zu einer als "steady state stacking" (61) bezeichneten Anordnung aller Komponenten (Abb. 18). Sie erfolgt streng nach der Mobilität; außerdem nehmen die Konzentrationen in Richtung des Nachlaufpuffers ab. Die Breite der einzelnen Proteinbanden richtet sich danach, wieviel von der betreffenden Sorte insgesamt vorhanden ist.

Proteine mit Mobilitäten, die größer sind als die des Vorlaufpuffers, können dem "stack" ebensowenig angehören wie solche, deren Mobilitäten geringer sind als die der nachlaufenden Anionen. Erstere laufen im allgemeinen schnell aus dem Gel heraus, letztere können erst gar nicht hinein.

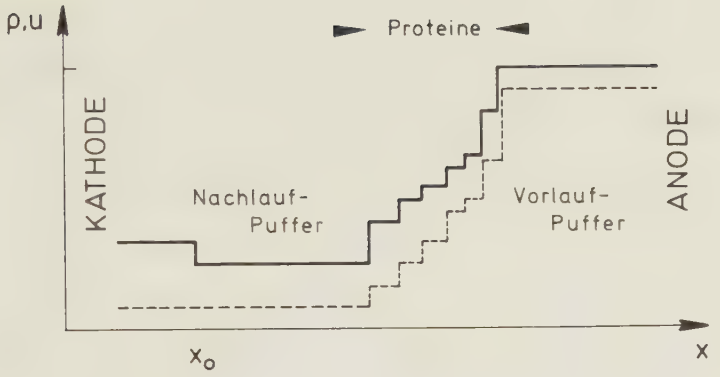

Abb. 18. Schematischer Verlauf von Ladungsdichte und Beweglichkeiten der Anionen in einem steady state stack.

Es ist offensichtlich, daß man durch geeignete Wahl der Pufferkonzentrationen ganz bestimmte Bereiche der Mobilitäten erfassen kann, die dem stack zugehören können (62). Auf diese Weise läßt sich bereits ein wesentlicher Trenneffekt erzielen.

Ein weiterer Vorteil der Methode ist, daß die durch die beharrliche Funktion des Vorlaufanions festgelegten Konzentrationen der einzelnen Proteinbanden recht hoch sein können, so daß die Banden entsprechend schmal sind. Dadurch

wird ein hoher Konzentrierungseffekt erzielt, der zu der beobachteten Trennschärfe im diskontinuierlichen Puffersystem führt.

Nachdem die Proteine im Sammelgel die Anordnung des steady state stack erreicht haben, treten sie in ein feinporiges siebendes Gel. Hier wird nun plötzlich die Mobilität der großen Proteinmoleküle erniedrigt, während der Nachlaufpuffer noch relativ unbehindert weiterwandern kann. Die scharfen Grenzen werden instabil und lösen sich auf; die Gesetze der kontinuierlichen Elektrophorese treten in Kraft. Die einzelnen Banden wandern nun auf einem Untergrund von Nachlaufpufferanionen gemäß ihren Mobilitäten und Feldern. Die Anordnung wird sich dabei im allgemeinen kaum ändern.

Was nun geschieht, ist ein Auseinanderziehen des steady state stack, da die relative Wanderungsgeschwindigkeit eines Proteins dem Logarithmus seines Molekulargewichtes proportional ist (46). Die Verbreiterung der einzelnen Proteinbanden wird durch Diffusion verursacht.

2.4.2. SDS-Gelelektrophorese im diskontinuierlichen Puffersystem

Als Puffersystem wurde das von WAEHNELDT u. MANDEL (63) beschriebene Tris/Cl-Tris/Glycin-Puffersystem unter Zusatz von 0.1 % SDS verwendet. Dieses System hat sich wegen seiner außerordentlich guten Trennschärfe bewährt (s.a. 64).

2.4.2.1. Behandlung der Proteinproben

SDS-Extraktion. Da die Membranproteine wasserunlöslich sind, müssen sie mit Hilfe von SDS (Natriumdodecylsulfat) in Lösung gebracht werden (23). Durch hydrophobe Bindung des SDS-Monomers ($CH_3(CH_2)_{11}OSO_3$ Na; MG 288.4) an die Proteine bilden sich lösliche SDS-Proteinkomplexe aus. REYNOLDS u. TANFORD (65) konnten zeigen, daß die Bindungsrate der Proteine an das SDS-Monomer bei einer großen Anzahl von Proteinen etwa gleich groß ist und daß mit 1.4 g SDS pro 1 g Protein die maximale Beladungsstufe erreicht wird. Die Bindung ist unabhängig von der Ionenstärke der Probenlösung, mit ansteigender Ionenstärke sinkt jedoch die kritische Mizellkonzentration (CMC) des SDS. Da nur das SDS-Monomer zur Bindung befähigt ist und nicht die SDS-Mizellen, sollte die Ionenstärke der Probe möglichst gering sein, um die Konzentration am SDS-Monomer zu erhöhen. Durch SDS werden intermolekulare Bindungen der Proteine gelöst, ohne kovalente Bindungen zu beeinflussen.

Ein besonderer Vorteil ist zusätzlich, daß Lipide und Nukleinsäuren vor der elektrophoretischen Trennung nicht entfernt werden müssen, da die nichtkovalenten Wechselwirkungen zwischen diesen und den Proteinen völlig aufgehoben werden (55, 65).

Nach WEBER et al. (45) muß das Verhältnis SDS zu Protein mindestens 3:1 (g/g) betragen; RÜCHEL et al. (55) empfehlen einen zehnfachen Überschuß an SDS. Bei den vorlie-

genden Proteinen hat sich ein achtfacher Überschuß als ausreichend erwiesen. Die Membranproteine wurden in einer 0.4%igen SDS-Lösung extrahiert (0.5 mg Protein/ml) und nach Zusatz von Bromphenolblau als Frontmarker und von Zuckerlösung zur Erhöhung der Dichte auf die Gele aufgetragen. Damit die Proteine in Lösung bleiben, muß immer ein Überschuß an SDS vorliegen. Da das SDS-Anion eine sehr große elektrophoretische Beweglichkeit hat, läuft es im "steady state stack" voraus und würde aus der Probe sehr schnell entfernt werden. Zusätzlich käme es auch zu einer Ablösung des an die Proteine gebundenen SDS-Monomers (55). Aus diesem Grund wurde dem kathodischen Puffer SDS zugesetzt (0.1 %); dadurch wird während des elektrophoretischen Laufs zur Stabilisierung der SDS-Proteinkomplexe SDS ständig in ausreichender Konzentration nachgeliefert. Die Einpolymerisierung von SDS in die Gele erweist sich als unnötig. Das einpolymerisierte SDS läuft aufgrund seiner großen Mobilität vor der Probe aus dem Gel, daher ist das Trennbild mit und ohne SDS-Einpolymerisierung identisch.

Reduktion der Proteine. Zur einwandfreien Bestimmung der Molekulargewichte der Proteine ist eine gleichmäßige, vollständige SDS-Beladung eine unbedingte Voraussetzung. Bei Bildung von inter- oder intramolekularen Disulfidbrücken ist dies nicht gewährleistet (58, 65).

Als Reduktionsmittel zur Spaltung der Disulfidbrücken

hat sich in der Praxis 2-Mercaptoäthanol bewährt. Da die Reduktionsreaktion reversibel ist, kann es zu einer Rückbildung von Disulfidbrücken kommen. Dabei können neue Produkte entstehen, weil nicht gewährleistet ist, daß die alten Bindungen wieder identisch geschlossen werden. Aus diesem Grund ist die Dialyse, die von einigen Autoren zur Beseitigung überschüssigen Reduktionsmittels empfohlen wird (47, 59, 66), abzulehnen. Die Rückbildung der Disulfidbrücken nach Dialyse konnte von RÜCHEL et al. (66) am Beispiel des wasserlöslichen Bence-Jones-Proteins und am Wolfgram-Protein des Myelins nachgewiesen werden. Der gleiche Effekt konnte auch bei den hier verwendeten Proteinen gezeigt werden.

Zur Reduktion einer gelösten Proteinprobe wurden 1 % (v/v) 2-Mercaptoäthanol zugesetzt, die Probe erhitzt (100^{o}, 1 min) und nach dem Abkühlen zur Elektrophorese verwendet. Die Reduktion muß unter vollständigem Luftabschluß durchgeführt werden, da es sonst zur Ausbildung zufälliger, hochmolekularer Reoxidationsprodukte kommt, die auf dem Gelkopf liegenbleiben (Abb. 19/4, 5). Aus dem gleichen Grund darf das Reaktionsgefäß nicht vor dem vollständigen Erkalten geöffnet werden.

Die Bandenbilder der reduzierten Proteine wiesen in Trennungen paralleler Läufe eine Inkonstanz auf, die möglicherweise auf Reoxidationsprozesse während oder kurz vor der Elektrophorese zurückzuführen ist. Von verschiedenen

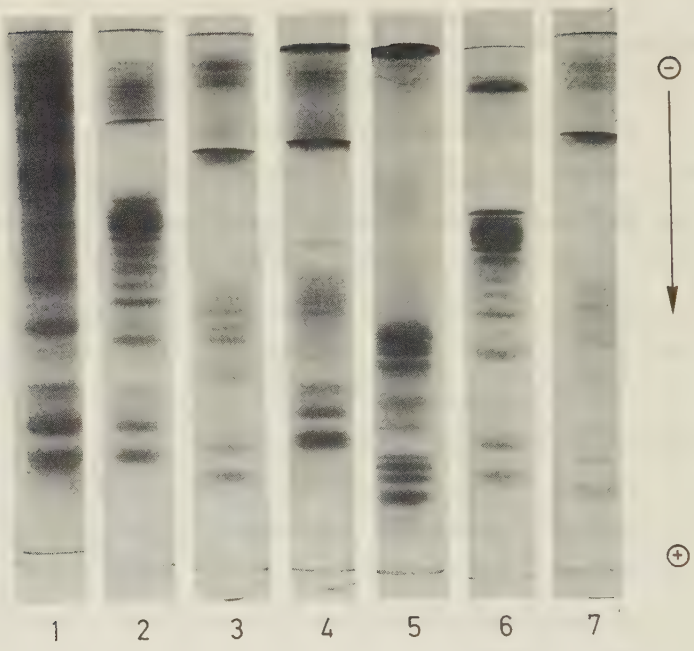

Abb. 19. Trennung der Proteine des Totalhomogenats im diskontinuierlichen Puffersystem.

1 Probe im Standardpuffersystem,
2 Probe, reduziert mit 1 % Mercaptoäthanol,
3 Probe, reduziert mit 5 % Mercaptoäthanol,
4 Probe, reduziert wie 3 in Gegenwart von Luft,
5 Probe, reduziert wie 3, Gelpuffer enthält 0.4 % SDS zur Beseitigung der SDS-Präzipitationsbande,
6 Probe, reduziert wie 2, zusätzlich 0.1 % Mercaptoäthanol im Puffer,
7 Probe, reduziert wie 3, zusätzlich 0.1 % Mercaptoäthanol im Puffer.

Die SDS-Mangelbande ist besonders deutlich in den Gelen 2, 3, 4, 6 und 7 zu erkennen.
(Gele 12 %; Anfärbung mit Coomassie-Blau).

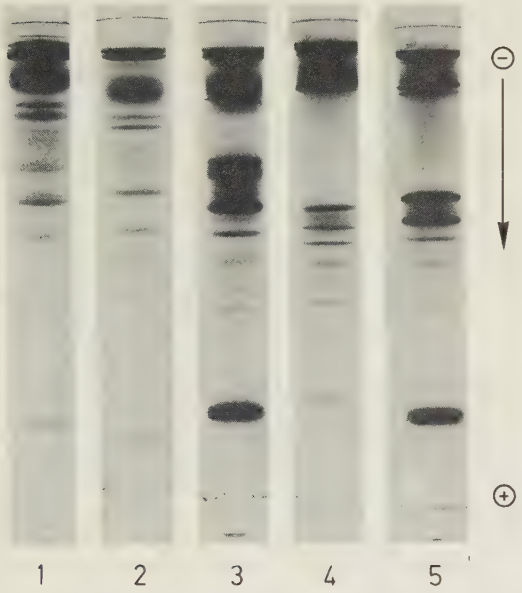

Abb. 20. Trennung der Proteine der Erythrozytenmembranen im diskontinuierlichen SDS-Puffersystem.

1 Probe im Standardpuffersystem,
2 Probe, reduziert mit 1 % Mercaptoäthanol,
3 Probe wie 1, gemischt mit reduzierten Markerproteinen,
4 Probe, reduziert wie 2, zusätzlich 0.1 % Mercaptoäthanol im Puffer,
5 Probe wie 2, gemischt mit reduzierten Markerproteinen, außerdem 0.1 % Mercaptoäthanol im Puffer.

Autoren wird in kontinuierlichen Puffersystemen dem kathodischen Puffer 2-Mercaptoäthanol zugesetzt, um so den reduzierten Zustand aufrechtzuerhalten (67, 68). Zur Überprüfung des Einflusses von 2-Mercaptoäthanol auf die Elektrophorese wurden gleichartige Versuche durchgeführt und dem kathodischen Puffer 2-Mercaptoäthanol in verschiedenen Konzentrationen zugesetzt (Abb. 19, 20). Dadurch wurde zwar eine Stabilisierung des Bandenbildes erreicht, aber bei allen Trennungen fiel eine Verschiebung des Bandenbildes auf (Abb. 19/2 - 7). Die Ursache der Veränderung des Trennbildes wird an Hand von bekannten Proteinen im folgenden gezeigt und erklärt.

2.4.2.2. Untersuchung der bei den Trennungen aufgetretenen Artefakte

Verschiebung des Bandenbildes zur Anode. Zur Untersuchung der Verschiebung des Trennbildes wurde ein Gemisch der Markerproteine Conalbumin (MG 77000), Humanalbumin (MG 69000), Ovalbumin (MG 45000) und Cytochrom c (MG 12100) verwendet.

Das Bild der elektrophoretischen Trennung dieser reduzierten Proteine wies auch nach Überwanderung mit 2-Mercaptoäthanol noch keine Verschiebung auf (Abb. 21/1, 2). Wurde aber ein Gemisch von reduzierten Markerproteinen mit reduziertem Totalhomogenat aufgetragen, d.h. das Gesamtprobenvolumen und damit die absolute Menge an Mercapto-

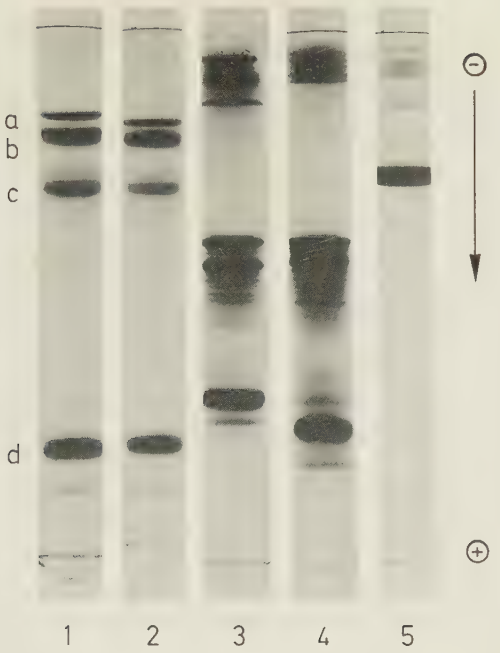

Abb. 21. Trennung der Markerproteine im diskontinuierlichen SDS-Puffersystem.

1 Markerproteine: a Conalbumin, b Humanalbumin, c Ovalbumin, d Cytochrom c.

2 Markerproteine wie 1, Zusatz von 0.1 % Mercaptoäthanol zum kathodischen Puffer,

3 Marker wie 1 und 2, aber verdünnt mit einer Lösung von 1 % Mercaptoäthanol in 0.4 % SDS (1:4),

4 Totalhomogenat, reduziert mit 1 % Mercaptoäthanol, gemischt mit Markerproteinen wie 1, zusätzlich 0.1 % Mercaptoäthanol im Puffer,

5 Rinderserum - Albumin, im Standardpuffersystem getrennt.

äthanol vergrößert, so war eine anodische Verschiebung des Trennbildes auffällig (Abb. 21/4). Daß diese Verschiebung nicht von der Art und Menge des aufgetragenen Proteins abhängig ist, wird aus Abb. 21/3 ersichtlich. Hier wurde lediglich das Markergemisch mit einer Lösung von 1 % Mercaptoäthanol in 0.4 % SDS vierfach verdünnt und von dieser Lösung entsprechend mehr aufgetragen. Durch weitere Verdünnung konnte gezeigt werden, daß die Größe der "Lücke" im gefärbten Gel mit Erhöhung der Mercaptoäthanol-Konzentration zunimmt. Bei dieser Lücke handelt es sich also offensichtlich um eine "Mercaptoäthanolbande", die sich mit steigender Mercaptoäthanol-Konzentration verbreitert. Diese Bande befindet sich erwartungsgemäß im Bereich der langsameren Proteine, da die Mobilität des Reduktionsmittels wegen seiner geringen Ladung nur klein ist.

Auffällig ist bei den Trennbildern die Anhäufung von schlecht getrennten Proteinbanden direkt vor der "Mercaptoäthanolbande" (Abb. 19, 20). Diese Banden sind im Gegensatz zu den niedermolekularen Proteinen, die ihre Laufgeschwindigkeit beim Vergleich mit Trennungen ohne Reduktionsmittelzusatz nicht geändert haben, offensichtlich beschleunigt worden (s. Abb. 22). Dieser Effekt kann folgendermaßen erklärt werden: Beim Eintritt in das siebende Gel werden die Proteinmakroionen in ihrer Beweglichkeit herabgesetzt, die kleinen Ionen des Mercaptoäthanols und des Glycins werden dagegen weniger behindert. Als

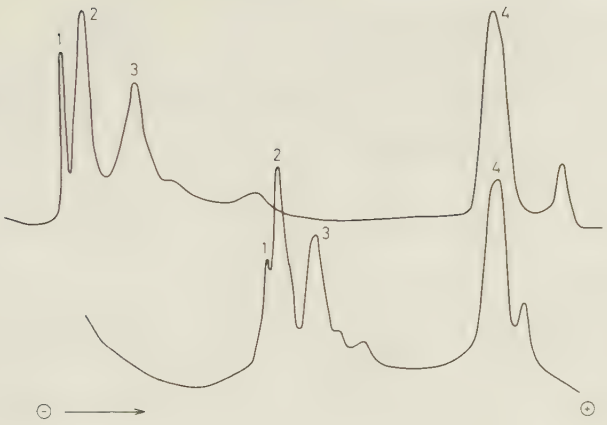

Abb. 22. Densitometerkurven der Trennung von Markerproteinen.

1 Conalbumin,
2 Humanalbumin,
3 Ovalbumin,
4 Cytochrom c,

Oben: Trennung der reduzierten Markerproteine,
Unten: Trennung der gleichen Probe, verdünnt mit Mercaptoäthanol 1 % in 0.4 % SDS (1:4).

Die drastische Verschiebung zur Anode ist hier besonders gut zu erkennen.

schnellstes Ion überholt Glycin die anderen Ionen. Sobald aber ein Protein von Mercaptoäthanol statt von Glycin umgeben wird, befindet es sich wegen der herabgesetzten Leitfähigkeit in einem stärkeren elektrischen Feld und

wird daher beschleunigt. Je näher eine Proteinbande der Mercaptoäthanolbande liegt, desto stärker ist dieser Einfluß. Im ganzen schiebt also das Mercaptoäthanol die vor ihm herlaufenden Proteinbanden zusammen. Der Trenneffekt wird darum in diesem Bereich herabgesetzt.

Abb. 23. Molekulargewichtsdiagramme der Markerproteine.
Δ—Δ : Markerproteine (unverdünnt),
o—o : Markerproteine, 1:4 verdünnt mit 1 % Mercaptoäthanol in 0.4 % SDS,
●—● : Markerproteine, 1:8 verdünnt wie oben.

Zur Abschätzung der Molekulargewichte unbekannter Proteine und zur Bestimmung des Bereichs, in dem Reduktion stattgefunden hat, ist es wegen der Trennbildverschiebung unumgänglich, bekannte Markerproteine zuzumischen. Die Molekulargewichtsdiagramme der Markerproteine zeigen, daß trotz der Bandenverschiebung eine gut auszuwertende Kurve erhalten wird (Abb. 23). Die aus den Densitogrammmen ermittelten Laufstrecken (in cm) wurden gegen den Logarithmus der Molekulargewichte aufgetragen. Die Molekulargewichte unbekannter Proteine können nach Bestimmung ihrer Laufstrecke im Zumischversuch abgelesen werden.

Ausbildung von artefiziellen Banden durch SDS-Mangel. Bei den meisten Trennungen der reduzierten Proben fielen ausgeprägte Banden auf (Abb. 19, 20), die im folgenden als SDS-Mangelbanden bzw. SDS-Präzipitationsbanden bezeichnet werden sollen. Als solche wurden sie identifiziert, da sie durch Erhöhung der SDS-Konzentration im kathodischen Puffer zum Verschwinden gebracht werden konnten (Abb. 19/5). Ihr Auftreten erklärt sich folgendermaßen: Geraten die Proteine in den Bereich des Mercaptoäthanols, werden die Ionen beschleunigt. Das zur Stabilisierung der SDS-Proteine unbedingt nötige SDS-Anion wird somit durch Beschleunigung entfernt, es kann sogar zu einer partiellen SDS-Entladung der Proteine kommen, wodurch ihre Mobilität drastisch gesenkt wird. Dieser Vorgang führt zu den ausgeprägten

Präzipitationsbanden (Abb. 19). Die Möglichkeit der SDS-Entladung wurde von RÜCHEL et al. (55) am Beispiel des Albumins auf Mikrogradientengelen gezeigt und erklärt. Hier führte die SDS-Entladung zu einer Vielzahl von Banden, die sich von "normalen" Banden nicht unterscheiden lassen. Abb. 21/5 zeigt das Trennbild von Rinderalbumin auf den hier verwendeten Gelen. Neben den auch sonst vorhandenen vier Albuminbanden (Mono-, Di-, Tri- und Tetramer) wurde eine große Anzahl von Banden angefärbt. Die zusätzlichen Banden stellen verschiedene Zerfallszustände der SDS-Proteinkomplexe dar.

Diese Banden sind wegen ihrer Unauffälligkeit besonders irreführend und können die Komplexität der Trennbilder ganz erheblich erhöhen. Der gleiche Effekt ist besonders deutlich in Abb. 21/3 zu sehen. Aus den ehemals vier Banden der Markerproteine sind vor allem unterhalb der Mercaptoäthanolbande (Lücke im Gel) durch den Zerfall der SDS-Proteinkomplexe eine Vielzahl von Banden entstanden.

Zur Beseitigung der ausgeprägten SDS-Mangelbande erwies sich eine Erhöhung der SDS-Konzentration im kathodischen Puffer auf 0.4 % als ausreichend (Abb. 19/5). Durch diese hohe SDS-Konzentration trat jedoch im Bereich der anodischen Wanderfront eine neue scharfe Bande auf (Abb. 19/5), die sich durch die quantitative Ausbildung verschiedener Zustandsformen des SDS im Gel erklären läßt. Bei diesen hohen Konzentrationen liegen neben SDS-Monomeren besonders

viele SDS-Mizellkomplexe kleinerer und größerer Art vor. Es kommt eventuell sogar zur Ausbildung flüssiger Kristallformen (55, 69). Im Gel können dadurch artefizielle Banden verursacht werden.

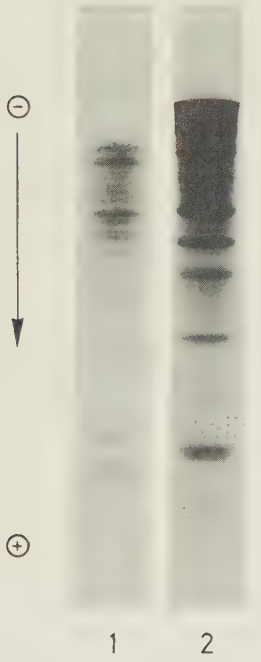

Abb. 24.
Trennungen im diskontinuierlichen SDS-Puffersystem (Gele 12 %, mit einem 4%igen Sammelgel überschichtet).

1 Totalhomogenat, mit 1 % Mercaptoäthanol reduziert,
2 Erythrozytenmembranen, mit 1 % Mercaptoäthanol reduziert.

Im Zweifelsfall muß die Gelkonzentration herabgesetzt werden, um über die verminderte Siebung der SDS-Proteinkomplexe deren Stabilität zu erhöhen, so daß eine 0.1%ige SDS-Konzentration im Laufpuffer ausreicht. Dabei muß dann aller-

dings eine Verminderung der Trennqualität in Kauf genommen werden.

Bei Verwendung eines konventionellen Sammelgels wurden die oben beschriebenen Artefaktbildungen vermieden (Abb. 24). Hier war der Eintritt der "steady state stack"-Anordnung zu Beginn weniger siebenden Bedingungen unterworfen. Dadurch konnte eine Vortrennung erfolgen, die verhinderte, daß die Proteinmakroionen in den Bereich der Mercaptoäthanolbande gerieten.

Zusammenfassend läßt sich aus den vorangehenden Untersuchungen im diskontinuierlichen Puffersystem sagen, daß vier Zustände zu Komplikationen führen können:

1) Zuviel SDS führt zu Mizellkomplexen und damit zu der Ausbildung einer artefiziellen Bande im Bereich der anodischen Wanderfront;

2) zuwenig SDS führt zur Ausbildung von Präzipitationsbanden und zum Zerfall der SDS-Proteinkomplexe, wodurch eine Vielzahl neuer Banden entsteht;

3) zuviel Mercaptoäthanol verdrängt SDS aus einem größeren Gelbereich, was zu den gleichen Effekten wie bei 2) führt. Außerdem wird eine Mercaptoäthanolbande ausgebildet, und es kommt zu einer anodischen Verschiebung des Trennbildes;

4) zuwenig Mercaptoäthanol führt zu Reoxidationsprozessen und damit eventuell zu neuen Produkten. Bei Vor-

handensein oder Rückbildung von Disulfidbrücken ist keine gleichmäßige SDS-Beladung möglich.

Am besten erscheint demnach der Zusatz von viel SDS und möglichst wenig Mercaptoäthanol. Durch Verwendung von Gelen mit geringerer Polyacrylamidkonzentration oder solchen, die mit einem Sammelgel überschichtet wurden, können Artefakte weitgehend vermieden werden.

Die Anwendung der diskontinuierlichen SDS-Elektrophorese birgt nach obigen Untersuchungen viele Gefahren, und die Trennungen führen häufig zu nicht eindeutig interpretierbaren Ergebnissen. In Zweifelsfällen ist es daher zu empfehlen, die Proben zur Kontrolle auch in einem kontinuierlichen Puffersystem zu trennen. Hierbei muß dann die längere Laufzeit und die Unschärfe der Bandenbilder in Kauf genommen werden.

2.4.3. SDS-Gelelektrophorese im kontinuierlichen Puffersystem

Beim Vergleich der Trennbilder nach Elektrophorese im kontinuierlichen Phosphatpuffersystem war ein geringer Unterschied des Trennbildes einer reduzierten und einer nicht reduzierten Probe von Erythrozytenmembranen festzustellen (Abb. 25). Ein nachträglicher Reduktionseffekt durch Überwandern mit Mercaptoäthanol war nicht festzustellen. Die Anwesenheit von Mercaptoäthanol im kathodischen

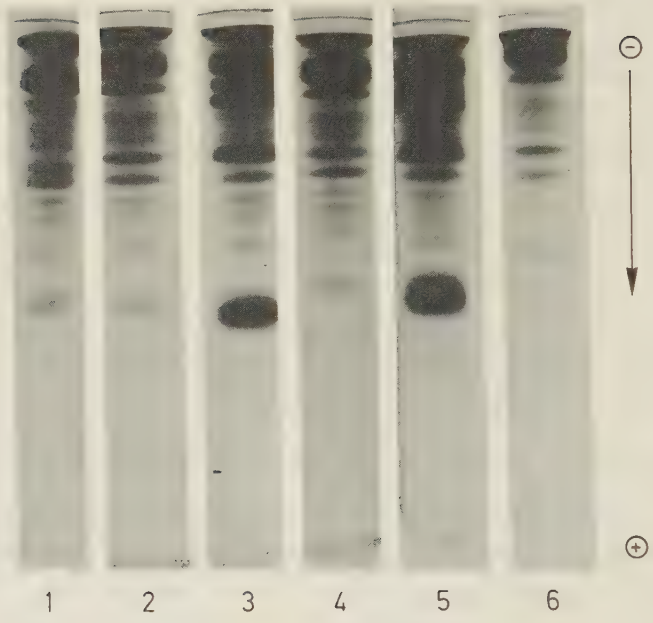

Abb. 25. Trennung der Erythrozytenmembranproteine im kontinuierlichen Phosphatpuffersystem (Gele 10 %; Färbung Coomassie-Blau).

1 Probe, getrennt im Standardsystem,
2 Probe, reduziert mit 1 % Mercaptoäthanol,
3 Probe wie 2, Markerproteine zugemischt,
4 Probe wie 2, zusätzlich 0.1 % Mercaptoäthanol im Puffer,
5 Probe und Puffer wie 4, Markerproteine zugemischt,
6 Probe wie 2, Zusatz von 0.05 % Thioglykolsäure zum kathodischen Puffer.

Abb. 26. Trennung der Membranproteine des Totalhomogenats im kontinuierlichen SDS-Phosphatpuffersystem.

1 Probe im Standardpuffersystem,
2 Probe, reduziert mit 1 % Mercaptoäthanol,
3 Probe wie 2, Zusatz von 0.05 % Thioglykolsäure zum Puffer (Gele 10 %),
4 Probe wie 1,
5 Probe wie 2, (Gele 12 %).

Puffer hatte auch auf das Trennergebnis des Totalhomogenats keinen Einfluß (Abb. 26).

Der geringe Effekt der Überwanderung mit Mercaptoäthanol deutet darauf hin, daß Mercaptoäthanol im SDS-Phosphatpuffersystem wegen seiner im Vergleich zum Phosphatanion geringen Mobilität kaum wandern kann. Zur Klärung dieser Frage wurde das Wanderungsverhalten von Mercaptoäthanol und zwei anderen gebräuchlichen Reduktionsmitteln in verschiedenen Puffersystemen untersucht.

2.4.4. Das Wanderungsverhalten von Reduktionsmitteln in verschiedenen SDS-Elektrophoresepuffersystemen

Neben 2-Mercaptoäthanol wird seit einigen Jahren Dithiothreitol und sein Isomer Dithioerythritol als Disulfidbrücken spaltendes Reagenz verwendet. Es wurde 1963 von CLELAND (70) als Reduktionsmittel eingeführt und ist wegen seines niedrigen Redoxpotentials besonders zum Schutz der entstandenen Monothiolgruppen geeignet. Daneben gilt auch Thioglykolsäure als gut zu verwendendes Reduktionsmittel. Da Thioglykolsäure stärker dissoziiert ist als Mercaptoäthanol, ist zu erwarten, daß durch die damit verbundene höhere elektrophoretische Mobilität dieses Reduktionsmittel während der Elektrophorese besser transportiert wird.

Zum Nachweis dieser Reduktionsmittel im Gel oder Puffer wird das für SH-Gruppen spezifische Reagenz Nitro-

prussid-Natrium verwendet. Der Komplexbildner wird allgemein in der organischen Chemie bei qualitativen Elementaranalysen zum Nachweis von organisch gebundenem Schwefel verwendet. Bei Anwesenheit von Sulfidionen bildet sich mit einer frisch bereiteten Lösung von Natriumnitrosylprussiat ($Na_2[Fe(CN)_5NO]$) eine rotviolette Farbe, die durch Ausbildung des Komplexsalzes ($Na_4[Fe(CN)_5NOS]$) entsteht (71). (Siehe auch WEBER et al., 45.)

Um nachzuweisen, ob und wie weit ein Reduktionsmittel während der Elektrophorese in die Gele transportiert wird, wurde dem kathodischen Puffer eines Leeransatzes (ohne Proteinbeladung der Gele) jeweils 0.1 % des Reduktionsmittels zugesetzt. Nach den üblichen Trennzeiten wurden die Gele und der anodische Puffer auf ihren Gehalt an SH-Gruppen hin untersucht. Die Ergebnisse des Nitroprussidtestes sind in Tab. 4 zusammengefaßt.

Tabelle 4.

	Mercapto-äthanol	Dithio-threitol	Thioglykol-säure	Puffersystem
SH-Test im Gel	-	-	+	kontinuierlich
SH-Test Puffer	-	-	+	Phosphatpuffer
SH-Test im Gel	+	+	++	diskontinuierlich
SH-Test Puffer	+	+	++	Tris/Glycin-Tris/Cl

Im kontinuierlichen Puffersystem war die Reaktion nur positiv nach Zusatz von Thioglykolsäure. Dagegen wurden im diskontinuierlichen Puffersystem alle drei Reduktionsmittel in die Gele transportiert. Besonders stark war die Farbkomplexbildung nach Zusatz von Thioglykolsäure, da dieses Reduktionsmittel erwartungsgemäß am besten transportiert wurde. Der Zusatz von Mercaptoäthanol im kontinuierlichen Puffersystem, wie er von einigen Autoren empfohlen wird (67, 68), ist demnach sinnlos, denn das Reduktionsmittel wird wegen seiner geringen elektrophoretischen Mobilität nicht in das Gel transportiert. Hier müßte auf Thioglykolsäure zurückgegriffen werden (Abb. 25/6, 26/3).

2.4.5. Reduktion eines Proteins während der Elektrophorese

Am Beispiel des Bence-Jones-Proteins konnte das Wanderungsverhalten und der Einfluß der Reduktionsmittel mit Hilfe von Mikrogradientengelen (55) demonstriert werden.

Bei der Elektrophorese des Bence-Jones-Proteins ohne Reduktionsmittelzusatz sind im Pherogramm zwei Hauptbanden erkennbar (Abb. 27/a), die dem Monomer (I) bzw. dem Dimer (II) entsprechen. Daneben enthält das Präparat eine geringe Menge eines langsamer wandernden Proteins (mit ← markiert), das nicht reduzierbar ist und daher als Markerprotein dienen kann. Bei Reduktion während der Elektrophorese kommt es zur sukzessiven Umwandlung des Dimers zum Monomer (Abb. 27/c). Das gebildete Monomer wird weiter-

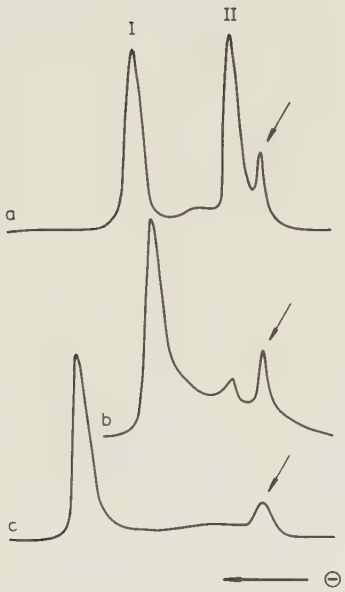

Abb. 27. Trennung des Bence-Jones-Proteins im diskontinuierlichen Tris/Glycin-Tris/Sulfat-System.
(I Monomer, II Dimer; Gele: 1-40 % Gradienten).

a Trennung im Standardpuffersystem,

b Zusatz von 0.15 % Mercaptoäthanol zum Puffer
(nach 30 min ist bei 40 Volt der größte Teil des Dimers zum Monomer zerfallen),

c gleiche Bedingungen wie bei b, Erhöhung der Spannung auf 60 Volt
(nach 20 min ist praktisch kein Dimer mehr nachzuweisen. Alles Monomere ist im Bereich seines Porenlimits zu einer scharfen Bande formiert. Der gleiche Effekt läßt sich bei konstanter Spannung und verlängerter Dauer der Elektrophorese erzielen. Die Reduktion während der Elektrophorese ist in gleicher Weise zeit- und spannungsabhängig).

transportiert und vereinigt sich nach einiger Zeit mit der ursprünglichen Monomerbande. Die dritte langsam wandernde Bande bleibt an ihrem ursprünglichen Gelort.

Abb. 27 und 28 zeigen die Wirkung der Reduktionsmittel auf das vorher nicht reduzierte Protein. Im kontinuierlichen System war ein Reduktionseffekt nur bei Zusatz von Thioglykolsäure zum Elektrophoresepuffer eingetreten (Abb. 28). Im diskontinuierlichen Puffersystem hingegen bewirkte schon der Zusatz von Mercaptoäthanol eine vollständige Reduktion des Dimers zum Monomer (Abb. 27).

Die Ergebnisse der Trennungen des Bence-Jones-Proteins weisen also auf die Möglichkeit hin, Proteine auch während der Elektrophorese zu reduzieren. Dies hat den Vorteil, daß die Reaktion unter vollständigem Luftabschluß ablaufen kann. Außerdem wird so die Reduktion von sehr kleinen Proteinmengen ohne Substanzverlust möglich.

Zum Nachweis der Reduktion während der Elektrophorese sind allerdings nur die hier verwendeten steilen Gelgradienten (72) (1-40 % Acrylamid) anwendbar. Schon bei der Verwendung eines flachen Gelgradienten (1-10 %) wandert das während der Elektrophorese reduzierte Dimer in einigem Abstand hinter dem monomeren Protein. Noch deutlicher ist dies bei 10%igen homogenen Gelen zu sehen (Abb. 28/c), wo das nachträglich gebildete Monomer in konstantem Abstand zur ursprünglichen Monomerbande wandert. Die Vereinigung der beiden Proteinbanden kann nicht erfolgen, weil nach

Abb. 28. Trennung des Bence-Jones-Proteins im kontinuierlichen Phosphatpuffersystem.

(I Monomer, II Dimer).

a Trennung ohne Zusatz von Reduktionsmitteln,

b Zusatz von 0.3 % Thioglykolsäure

(eine merkliche Reduktion der Dimerbande wurde erzielt. Die Reduktion ist noch unvollständig, kann aber durch Verlängerung der Dauer der Elektrophorese vervollständigt werden).

Gele bei a und b: 1-40 % Gradienten.

c Probe und Puffer wie b, Trennung jedoch in einem 10%igen homogenen Gel

(es kommt in Ermangelung eines Porengradienten zu keiner Vereinigung der ursprünglichen Monomerbande mit dem während der Elektrophorese reduzierten Monomer).

dem Eintritt des "steady state stack" in das Trenngel die Gesetze der kontinuierlichen Elektrophorese gelten. Nur bei Verwendung des steilen Gelgradienten ist eine nachträgliche Konzentrierung von Makroionen gleicher Beschaffenheit in einem Gelort möglich, weil die Poren in diesem steilen Gradienten für alle Proteine zu klein werden und es zu dem sogenannten "dead stop" der Proteine kommt (72, 73).

Für die elektrophoretische Reduktion sind also nur die 1-40 %igen Gradientengele in Verbindung mit einem diskontinuierlichen Puffersystem geeignet.

2.4.6. Carboxymethylierung der reduzierten Probe

Eine weitere Möglichkeit, die bei der Reduktion entstandenen Monothiolgruppen zu schützen, ist die Alkylierung der SH-Gruppen mit Jodoacetamid. Diese Art der Stabilisierung ist jedoch nicht zu verwenden, wenn die Proteine einer weiteren Analyse unterworfen werden sollen, da eine chemische Umwandlung erfolgt (74).

Die erfolgreiche Carboxymethylierung wird in Abb. 29 am Beispiel des Bence-Jones-Proteins gezeigt, das einen definierten Gehalt an intra- und intermolekularen Disulfidbrücken hat. Durch die Reduktion mit Mercaptoäthanol wurde der Dimeranteil des Proteins zum Monomer umgewandelt und

mit Jodoacetamid stabilisiert. Auch nach Dialyse kam es zu keiner Reoxidation.

In Abb. 6/6 (Seite 25) ist das Trennbild der Proteine von synaptischen Vesikeln nach Reduktion und Carboxymethylierung dargestellt. Durch diese Behandlung werden eindeutig die Proteine charakterisiert, die reduzierbar sind, und es werden Trennbilder erhalten, die die Proteine als Monomere darstellen.

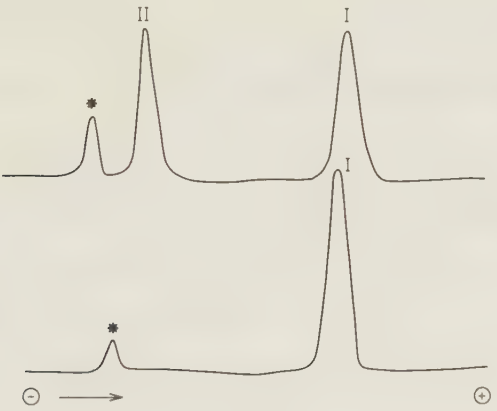

Abb. 29. Densitogramme einer Trennung des Bence-Jones-Proteins.

Oben: Bence-Jones-Protein, unreduziert in 0.4 % SDS,
Unten: Bence-Jones-Protein, reduziert, carboxymethyliert und dialysiert.

(Gele 12 %; I Monomer, II Dimer).

2.5. Zusammenfassung der Ergebnisse

Aus dem corticalen Gewebe von Rinderhirnen konnten durch differentielle Zentrifugation und Dichte-Gradienten-Zentrifugation synaptische Vesikel angereichert werden, deren Reinheit durch elektronenmikroskopische Untersuchungen und enzymatische Bestimmung geprüft wurde. Zur Charakterisierung und Reinheitsprüfung wurde die Bestimmung der freien Aminosäuren eingeführt. Diese Untersuchung zeigte, daß eine Vereinfachung des Aminosäurenmusters im Verlauf der subzellulären Fraktionierung auftrat und daß in den synaptischen Vesikeln aus Rinderhirn Glycin nachweisbar ist.

Die Membranproteine der synaptischen Vesikel wurden mit Hilfe der Polyacrylamid-Gelelektrophorese untersucht. Das erhaltene Bandenbild erwies sich als sehr komplex und zeigte, daß sich die Membranproteine der synaptischen Vesikel aus 6 Hauptproteinen und etwa 14 Nebenproteinen zusammensetzen, deren Molekulargewichte im Bereich von 14000-170000 liegen. Neben zwei anderen Glykoproteinen wurde als ein Hauptbestandteil der synaptischen Vesikel ein saures, mit Triton X-100 extrahiertes Glykoprotein identifiziert, das ein Molekulargewicht von 45000 aufweist und einen Anteil von ca. 10 % am Gesamtproteingehalt der Vesikel hat.

Die Anwendung der SDS-Gelelektrophorese erforderte

zunächst eingehende methodische Untersuchungen, die unterschiedliche Literaturangaben klären sollten. Das Auftreten von zwei methodisch bedingten Artefaktbildungen konnte demonstriert und erklärt werden: die Ausbildung von "SDS-Mangelbanden" und eine anodische Verschiebung des elektrophoretischen Trennbildes nach Behandlung mit dem Disulfidbrücken spaltenden Agens 2-Mercaptoäthanol. Das Wanderungsverhalten von drei zur Spaltung von Disulfidbrücken gebräuchlichen Reduktionsmitteln (2-Mercaptoäthanol, Dithiothreitol, Thioglykolsäure) wurde in verschiedenen Puffersystemen untersucht und ihr Einfluß auf Proteine während der Elektrophorese gezeigt. Außerdem wurden Möglichkeiten getestet und Methoden angegeben, den reduzierten Zustand der Proteine aufrechtzuerhalten, um so eine einwandfreie Molekulargewichtsbestimmung durchführen zu können.

2.6. Schlußfolgerungen

Abschließend sollen Schlußfolgerungen diskutiert werden, die sich aus den vorliegenden Untersuchungen ziehen lassen.

Ein methodischer Gesichtspunkt betrifft vor allem die Anwendung der Polyacrylamid-Gelelektrophorese zur Fraktionierung von Proteingemischen. Wie sich zeigen ließ, können die Trennbilder je nach der Proteinvorbehandlung und den elektrophoretischen Trennbedingungen erheblich variieren und durch Artefaktbildungen verfälscht werden. Wenngleich

die wichtigsten dieser Veränderungen aufgrund theoretischer Überlegungen qualitativ verstanden werden konnten, ist es doch in der Praxis äußerst wichtig, bei allen Untersuchungen gleiche experimentelle Bedingungen einzuhalten. Nur so läßt sich die elektrophoretische Analyse zum Vergleich von Präparationen und zur Reinheitsprüfung heranziehen. Für die vergleichende Elektrophorese erscheint es ausreichend, die Proteine ohne vorherige Reduktion zu trennen. Zur Bestimmung von Molekulargewichten müssen dagegen die Proteine vor der elektrophoretischen Trennung reduziert werden, und der reduzierte Zustand ist während der Elektrophorese aufrechtzuerhalten.

Die weiteren Überlegungen schließen sich an die Untersuchungen zur Charakterisierung der Membranproteine der synaptischen Vesikel an. Die Proteine, die im elektrophoretischen Trennbild am markantesten erscheinen, besitzen Molekulargewichte zwischen 17500 und 60000, mit einem Mittel von etwa 40000.

Nach BRECKENRIDGE et al. (86) ist das Gewichtsverhältnis von Lipiden zu Proteinen der Vesikelmembran 1.5 (g/g). Wird für die Lipide ein mittleres Molekulargewicht von 800 angenommen (87), so ergibt sich für das Zahlenverhältnis von Lipid zu Proteinmolekülen $1.5 \cdot 40000/800 = 75$. Ein Proteinmolekül wird also von etwa 75 Lipidmolekülen umgeben.

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen ergaben,

daß der Durchmesser der synaptischen Vesikel etwa 400 Å beträgt. Bei kugelförmiger Gestalt ist dann die Oberfläche der Vesikel 5.10^5 Å^2. Hieraus und aus dem obigen Zahlenverhältnis von 75 läßt sich die absolute Zahl von Proteinen pro Vesikel abschätzen, wenn für die Querschnittsflächen von Lipid- und Proteinmolekülen 60 bzw. 2000 Å^2 eingesetzt werden (87).

Für das Modell einer reinen Lipid-Doppelschichtmembran, an der die Proteine innen und außen haften (ROBERTSON (5) und DANIELLI u. DAVSON (6)), ergeben sich 16000 Lipid- und 210 Proteinmoleküle pro Vesikel.

Nach der Vorstellung eines flüssigen Mosaiks (SINGER u. NICOLSON (8)) sind die Proteine in die Lipidmembran eingelagert. Für dieses Modell ergibt die Rechnung 11500 Lipid- und 150 Proteinmoleküle pro Vesikel.

Diese Abschätzungen sind zwar mit Unsicherheiten von etwa 20 % behaftet, geben jedoch die Größenordnung der Zahl von Proteinmolekülen pro Vesikel an. Eine Entscheidung für das eine oder andere Modell kann im Rahmen der hier durchgeführten Untersuchungen nicht getroffen werden.

Die Zahl von 150-200 Proteinmolekülen pro Vesikel legt es nahe, Proteine mit einem prozentualen Anteil unter etwa 5 % am Gesamtproteingehalt der Vesikelfraktion (s. Tab 2, Seite 26) auf Verunreinigungen zurückzuführen. Es erscheint sinnvoll, lediglich die Proteine mit einem Anteil von 10 % und mehr am Gesamtproteingehalt als vesikelspezifisch an-

zunehmen, da diese dann auf der Vesikelmembran mit mindestens 15 Molekülen vertreten sind.

Mit Triton-X-100 sind 35 % der Gesamtproteine der synaptischen Vesikel extrahierbar, wovon etwa 70 % als Glykoproteine identifiziert werden konnten (s. Tab. 2 und 3, Seiten 26 und 39). Mit 25 % Anteil am Gesamtprotein, also 40-50 Moleküle pro Vesikel, stellen die Glykoproteine eine so bedeutende Komponente dar, daß ihnen höchstwahrscheinlich eine spezifische Funktion zugeordnet werden kann. Ob die Glykoproteine an dem erwähnten Exocytose-Prozeß der synaptischen Vesikel beteiligt sind, indem sie eventuell bei dem dafür benötigten Erkennungsmechanismus als Rezeptorsubstanzen dienen, muß weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben.

3. Experimenteller Teil

3.1. Beschreibung der Versuche

3.1.1. Isolierung der Membranproteine

Für die Aufarbeitungen wurden folgende Geräte verwendet:

Zentrifugen Sorvall RC 2-B,

Rotoren: SS 34, GSA (1.5 l), GS-3 (311);

Heraeus Christ Omega 60000,

Rotoren: W 60 (8x12 ml), W 30 (6x60 ml),

S 30 (3x30 ml), S 20 (3x75 ml);

(W = Festwinkelrotor, S = Schwenkbecherrotor).

Homogenisatoren Glas mit Teflonpistill (Braun, Melsungen), 60 ml Volumen.

Membranfiltrationsgerät (Sartorius-Membranfilter, Göttingen),

Filter: Zellulosenitratfilter (S M 113),

Porengröße: 0.45; 0.3; 0.2 µ.

Die Aufarbeitungen wurden im Kühlraum bei 4° C durchgeführt.

3.1.1.1. Isolierung der synaptischen Vesikel

Lösungen: 0.32 M Saccharose in 1 mM Na-Phosphatpuffer, 1 mM EDTA, pH 7.5;

1.6 M Saccharose in 1 mM Na-Phosphatpuffer, pH 7.5.

Von frischem Rinderhirn (etwa 30-60 min nach Tötung) werden 90 g der grauen Substanz mit einem Skalpell möglichst myelinfrei präpariert und mit 0.32 M Saccharose-Lösung zu einem 5%igen Homogenat verarbeitet. Dafür werden je 3 g Substanz in 60 ml Saccharose-Lösung bei 600 U/min (Pistill 6mal auf und ab bewegen) homogenisiert. Das Homogenat (1800 ml) wird vereinigt und folgendermaßen weiterverarbeitet:

1800 ml, 10 min bei 1000 g zentrifugieren, 2° C

Rückstand (ca. 100 ml)
verwerfen (Kernfraktion)

Überstand mit 0.32 M Saccharose auf 1800 ml auffüllen,
20 min bei 11500 g zentrifugieren, 2° C

Überstand (ÜS I) absaugen und verwerfen

Rückstand in 0.32 M Saccharose aufschütteln
(= 1. Waschung des synaptosomalen Sediments)
20 min bei 11500 g zentrifugieren, 2° C

Überstand (ÜS II) absaugen und verwerfen

Rückstand 2. Mal waschen und zentrifugieren wie vorher

Überstand (ÜS III)
absaugen und verwerfen

Rückstand (synaptosomale Anreicherung)

Für den "osmotischen Schock" der Synaptosomen wird die synaptosomale Anreicherung in 1 mM Phosphatpuffer pH 7.5 (4 ml/g Ausgangsgewicht) bei 2400 U/min homogenisiert (Pistill 10mal auf und ab bewegen). Das erhaltene Homogenat (360 ml) wird 60 min bei 25000 g zentrifugiert, 2° C,

Rückstand verwerfen

Überstand (ÜSO I) vorsichtig absaugen

Zum Überstand wird 1.6 M Saccharoselösung gegeben (4 Teile Überstand + 1 Teil 1.6 M Saccharose).
Die Suspension wird in die Becher des S-20-Rotors verteilt und mit 5-10 ml eiskalten Wassers überschichtet.

7 Stunden bei 45000 g zentrifugieren, 2° C,

Rückstand verwerfen

Die Überstände (ÜSO II) werden vorsichtig mit einer Spritze abgenommen und vereinigt.

Die Suspension wird nun durch Membranfilter absteigender Porengröße (0.45; 0.3; 0.2 µ) bei leichtem Unterdruck filtriert (Wasserstrahlpumpe). Das Filtrat wird mit 1 mM Phospatpuffer auf 10-15 ml aufgefüllt. Für die Proteingehaltsbestimmung nach Lowry (75) werden zwei Proben (0.2 und 0.4 ml) abgenommen. Die Suspension wird anschließend zu einem festen Niederschlag 30 min bei 100000 g zentrifugiert.

Für die elektronenoptischen Untersuchungen wird das frisch bereitete Sediment sofort verarbeitet. Die Proben für die anderen Untersuchungen werden bei 30° C eingefroren.

Ausbeute: 2-4 mg Protein.

Die Ausbeute an Vesikeln (in mg Protein) hängt stark von der Zentrifugationsdauer und der Porengröße der verwendeten Membranfilter ab. Im folgenden wird eine Übersicht gegeben über die wichtigsten Variationen, die durchgeführt wurden, und die dabei erhaltenen Ausbeuten.

Variationen der oben beschriebenen Methode:

Zentrifugationsdauer des ÜSO I + 1.6 M Saccharose	Porengröße der Filter in µm	Ausbeute in mg Protein
3 Stunden	0.6; 0.45	10.7
6 Stunden	0.6; 0.45	9
7 Stunden	0.6; 0.45	4-7 (4 Versuche)
8 Stunden	0.6; 0.45	3.6
9 Stunden	0.6	3
Isolierung nach MORGAN et al. (25) aus Rinderhirn		2.4

Die Ergebnisse der Isolierung nach der Methode von WHITTAKER et al. (18) und der durchgeführten Variationen sind auf Seite 93 dargestellt. Bis zur Bereitung des synaptosomalen Sediments wurde vorgegangen wie oben beschrieben.

Von der Suspension ÜSO I wurden jeweils 25 ml auf die angegebenen Zuckergradienten aufgetragen.

Durchgeführte Variationen der Methode von WHITTAKER et al. (18):

Zuckergradient	Zentrifugationszeit nach Auftragung auf den Gradienten	Porengröße der Filter in µm	Ausbeute in mg Protein
0.4 M (25 ml) 0.6 M (30 ml)	2 Std. (50500 g)	-	26
	(keine Zentrifugation nach osmotischem Schock) (18)		
0.4 M (25 ml) 0.6 M (25 ml)	5 Std. (50000 g)	0.4; 0.3; 0.2	9
0.4 M (25 ml) 0.6 M (25 ml)	6 Std. (45000 g)	0.6; 0.45; 0.2	12
0.32 M (25 ml) 0.6 M (25 ml)	5 Std. (45000 g)	0.6; 0.45	6.6
(zum osmotischen Schock wurde 2 ml Puffer/g Frischgewicht verwendet)			
0.32 M (25 ml) 0.6 M (25 ml)	7 Std. (45000 g)	0.6; 0.45; 0.2	1.6
(hier wurde wieder 4 ml Puffer/g Frischgewicht verwendet)			

Mit zunehmender Erhöhung der Ausbeute nahm auch die Komplexität der elektrophoretischen Trennbilder und die Aktivitäten der untersuchten Enzyme zu; die Reinheit der

Präparationen nahm also ab. Bei einer Ausbeute von 2-4 mg wurden die besten Ergebnisse erzielt (s. Seite 10).

3.1.1.2. Isolierung der Membranproteine des Totalhomogenats

Die Aufarbeitung wird bei Verwendung von Ratten- oder Rinderhirn gleichartig durchgeführt.

Das Gesamtgehirn der Ratte bzw. die graue Substanz von Rinderhirn wird in 0.01 M Tris/Cl-Puffer, pH 7, homogenisiert (5%iges Homogenat). Das Homogenat wird dreimal bei 100000 g je 1 Stunde zentrifugiert, der Überstand dekantiert und der Rückstand erneut in 0.01 M Tris-Puffer homogenisiert. Vor der letzten Zentrifugation wird eine Probe zur Proteingehaltsbestimmung genommen. Das Präzipitat wird bei -30° C im Tiefkühlschrank eingefroren.

3.1.1.3. Isolierung der Erythrozytenmembranen

Die Präparation von Erythrozytenmembranen erfolgt nach DODGE et al. (76). Danach werden 8 0 ml menschliches Blut zu 14 ml A.C.D-Lösung (s. u.) gegeben, die Mischung 20 min bei 1000 g zentrifugiert und dreimal mit isotonischem Puffer (s.u.) gewaschen. Zur Hämolyse wird das gewaschene Sediment in wenig isotonischem Puffer suspendiert, dann in 1120 ml hypotonischem Puffer (s.u.) überführt und während 40 min bei 20000 g zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt, der Rückstand dreimal mit hypotonischem Puffer

gewaschen und erneut zentrifugiert.

Vor dem letzten Zentrifugationsschritt wird eine Probe zur Proteinbestimmung entnommen. Die Ausbeute beträgt etwa 100 mg.

Lösungen:

A.C.D.: Trinatriumcitrat 22.0 g; Citronensäure 8.0 g; Glukose 24.5 g; Aqua bidest. ad 1000 ml.

Isotonischer Phosphatpuffer:

310 im Osm, pH 7.4;

NaH_2PO_4 0.155 M (21.4 g/l) Na_2HPO_4 0.103 M (14.6 g/l).

Hypotonischer Phosphatpuffer:

20 im Osm, pH 7.8;

Der isotonische Phosphatpuffer wird 1:15.5 verdünnt.

3.1.2. Proteinbestimmung nach LOWRY (75)

Lösungen:

A: Natriumcarbonat sicc. 15 g, Na^+-K^+-Tartrat x 4 H_2O 250 mg, NaOH 0.1 N ad 1000 ml (Fixanal);

B: Kupfersulfat x 5 H_2O 1%ige Lösung;

C: 1 ml Lösung B + 99 ml Lösung A;

D: Folin Ciocalteus-Phenolreagenz (Merck), 1:1 verdünnt mit H_2O.

Bestimmungsmethode:

Von den zu untersuchenden Lösungen werden 0.2 ml mit 5 ml Lösung C versetzt und geschüttelt. Nach 10 min bei Zimmertemperatur werden 0.5 ml Lösung D zugefügt und sofort stark geschüttelt. Nach 30 min (höchstens 2 Std.) Stehen bei Zimmertemperatur wird die Extinktion bei 660 nm im Spektrophotometer (Zeiss PMQ II) abgelesen.

Die Auswertung erfolgt mit Hilfe einer Eichkurve, als Eichsubstanz wird Rinderserumalbumin verwendet (Abb. 30). Die Kurve verläuft linear von 20 µg bis etwa 140 µg Protein, was einem Extinktionsbereich von ca. 0.05 bis 0.4 OD entspricht. Bei höheren Werten flacht die Kurve ab.

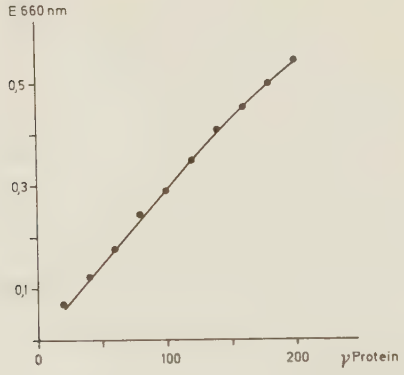

Abb. 30. Eichkurve von Rinderserumalbumin zur Proteinbestimmung nach LOWRY et al. (75).

Ist in der zu untersuchenden Proteinprobe Triton-X-100 enthalten, muß die Reaktionslösung kurz vor der Extinktionsmessung zentrifugiert werden, da bei Zugabe von Lösung C eine Trübung auftritt. Außerdem muß in diesem Fall die Eichkurve unter entsprechenden Bedingungen aufgestellt werden (mit BSA + Triton-X-100).

3.1.3. Enzymatische Bestimmungen

Geräte: Spectralphotometer Zeiss PM Q II;
Liquid Scintillation Spectrometer, Packard (Modell 3380).

Lactatdehydrogenase (77) (EC 1.1.1.27).
LDH katalysiert die Reaktion Pyruvat + NADH + H^+ —— Lactat + NAD^+.
Die Aktivitätsmessung erfolgt nach BERGMAIER (78).
Es wird die Absorptionsänderung bei 340 nm gemessen, die auf der Abnahme der NADH-Konzentration beruht.

Acetylcholinesterase (EC 3.1.1.7)
wird nach ELLMAN et al. (79) colorimetrisch durch Messung (bei 412 nm) eines aus Thiocholin und Dithiobisnitrobenzoat entstandenen Farbstoffes bestimmt.

Na^+-K^+-ATPase (EC 3.6.1.3.)
wird nach EMMELOT et al. (80) bestimmt. Als Substrat dient

dabei Adenosintriphosphat (ATP). Zuerst wird die Aktivität der Gesamt-ATPase (Na^+-K^+-Mg^{++}-ATPase) und anschließend, nach Hemmung mit Ouabain, die Mg^{++}-ATPase bestimmt. Der Gehalt an Na^+-K^+-ATPase ergibt sich aus der Differenz der Aktivitäten beider Enzyme. Das durch die Enzyme abgespaltene Phosphat wird nach FISKE/SUBBAROW (81) colorimetrisch bei 600 nm ermittelt.

5'-Mononucleotidase (EC 3.1.3.5)
wird nach EMMELOT et al. (80) mit Adenosinmonophosphat als Substrat wie Na^+-K^+-ATPase bestimmt.

Alkalische Phosphatase (EC 3.1.3.1)
Saure Phosphatase (EC 3.1.3.2.)
werden durch Messung der Gelbfärbung, die durch die Bildung von p-Nitrophenol aus p-Nitrophenylphosphat auftritt, bestimmt (Boehringer, Testfibel; 82). Die Messung der Extinktion erfolgt bei 405 nm.

β-Galactosidase (EC 3.2.1.23)
β-Glucosidase (EC 3.2.1.21)
werden nach GATT u. RAPPORT (83) ermittelt. Danach wird von o-Nitrophenyl-β-D-Galactopyranosid bzw. von p-Nitrophenyl-β-D-Glucopyranosid Nitrophenol abgespalten, das mit Natronlauge eine gelbe Farbe ausbildet, deren Absorption bei 420 nm gemessen wird.

Monoaminoxidase (EC 1.4.3.4)

wird nach WURTMAN u. AXELROD (84) bestimmt. Bei diesem Test wird der desaminierte ^{14}C-Metabolit von ^{14}C-Tryptamin im Scintillationsspectrophotometer gemessen.

3.1.4. Elektronenmikroskopie

Elektronenmikroskop Jeol 100 B.

3.1.4.1. Negativkontrastierung

Kleine Tropfen der Vesikelsuspension werden mit einer Pipette vorsichtig auf eine mit Formvar beschichtete Kupferblende gebracht und mit einer 2%igen Phosphorwolframsäure-Lösung kontrastiert (5 % PWS in H_2O wird mit 5 N KOH auf pH 7 gebracht und anschließend 1:2 mit einer 0.02%igen Rinderserumalbuminlösung versetzt). Die Präparate werden im Elektronenmikroskop bei Vergrößerungen von 17000-40000 untersucht. Zum Vergleich wurden auch Proben des verwendeten Puffers untersucht.

3.1.4.2. Positivkontrastierung

In der Ultrazentrifuge sedimentierte Vesikel werden 1.5 Stunden in 2.5%iger Glutaraldehydlösung vorfixiert. Nach 15 min wird das Sediment vorsichtig gewendet. Die Glutaraldehydlösung wird dekantiert und das Sediment 3mal je eine halbe Stunde mit isotonischem Phosphatpuffer ge-

waschen (116 ml 0.1 M Phosphatpuffer pH 7.2 + 7.93 g Saccharose). Anschließend erfolgt die Nachfixierung mit 1%iger Osmiumsäure (1 g Osmiumtetroxid, Merck, wird mit H_2O zu 2%iger Säure gelöst, Verdünnung vor Gebrauch 1:1 mit H_2O oder Barbiturątpuffer pH 7.3).

Die Probe wird 2 Std. unter gelegentlichem Umwenden in der Osmiumsäure belassen und danach erneut 2mal je 10 min mit Puffer (s.o.) gewaschen.

Anschließend wird in Alkohol ansteigender Konzentration entwässert: 5 min in 30 %, 5 min in 50 %, 30 min in 70 % (hierin kann die Probe eventuell über Nacht aufbewahrt werden), 30 min in 90 %, 2mal 30 min in 100 %. Bis zum 70%igen Alkohol werden alle Operationen im Kalten bei etwa 4° C durchgeführt. Nach der Entwässerung beginnt die Einbettung in Epon. Die Probe wird 2mal 10 min in Propylenoxid belassen. Dann wird sie in Propylenoxid/Epon 1:1 eine Stunde, Propylenoxid/Epon 1:2 eine Stunde (oder über Nacht) und anschließend 2mal je 3 Stunden in Epon pur belassen.

Die endgültige Einbettung erfolgt in Gelatinekapseln (0.36 ccm). Die Kapseln werden zu 1/3 mit Epon gefüllt und bei 60° C etwa 4 Stunden vorpolymerisiert. Die Probe wird nun in die Kapsel gegeben und die Kapsel mit Epon aufgefüllt. Zur Polymerisation werden die Präprate 5 Tage bei 45° C im Trockenschrank inkubiert. Die im Ultramikrotom (LKB-Ultrotome III) hergestelltèn Ultradünnschnitte (ca. 3000-5000 Å) werden auf mit Formvar beschichtete

Kupfernetzblenden gebracht und mit einer 1%igen Uranylacetatlösung kontrastiert. Nach 20 min wird mit H_2O gewaschen und Bleicitratlösung auf die Blende gegeben (1.33 g Bleicitrat + 1.76 Na-Citrat in 30 ml H_2O lösen, 30 min schütteln, Zugabe von 8 ml 1 N NaOh, mit H_2O auf 50 ml auffüllen). Nach etwa 8 min wird der Tropfen abgespült und die Blende im Exsikkator aufbewahrt. Die Schnitte werden im Elektronenmikroskop bei Vergrößerungen von 17000-50000 untersucht.

Ansatz für die Eponlösung:

Epon I: Epikote 812, 62 ml (75 g) + DDS, 100 ml (96.5 g),

Epon II: Epikote 812, 100 ml (121 g) + NMA, 89 ml (103 g),

Epon pur: Epon I, 5 ml (5.3 g) + Epon II, 5 ml (5.925 g) + DMP, 0.35 ml (7 Tropfen) etwa 5 min mit einem Glasstab gut mischen.

DDS = Dodenyl Succinic Anhydrid,

NMA = Nadic Methyl Anhydrid

DMP = (2.4.6-Tri(dimethylaminomethyl)phenol).

Alle Reagenzien zur Eponeinbettung wurden von SERVA geliefert.

3.1.5. Mikrobestimmung der Aminosäuren

Zur Bestimmung der freien Aminosäuren (39) wird 1 mg Rindercortex (Frischgewicht) bzw. 0.2 mg synaptische Vesikel

(bezogen auf Proteingehalt) in 20 µl $NaHCO_3$-Puffer 0.05 M, pH 10.2, 2 min im Mikrohomogenisator homogenisiert und 30 min im Kapillarrotor zentrifugiert. Zu 5 µl des Überstandes wird 5 µl eiskaltes Aceton zur Proteinfärbung zugesetzt, geschüttelt und 20 min bei -20° C aufbewahrt, bei 15000 U/min zentrifugiert (30 min). Zu 5 µl des Überstandes werden 5 µl Dansylchlorid gegeben und bei 37° C während 30 min inkubiert.

Die Lösung wird gefriergetrocknet und der Rückstand in 5 µl Aceton/Eisessig (3:2) aufgenommen. Von dieser Lösung werden jeweils 0.3 µl auf Polyamidplatten (3 • 3 cm^2) mit einer Mikropipette unter dem Stereomikroskop aufgetragen und mit den folgenden Laufmitteln zweidimensional entwickelt:

Laufmittel I: 3%ige Ameisensäure,

Laufmittel II: Benzol/Eisessig 9:1;

zur Trennung von Dans-NH_2 und Dans-Alanin bzw. Dans-Glutaminsäure und Dans-Asparaginsäure wird ein drittes Laufmittel eingesetzt:

Laufmittel III: Äthylacetat/Methanol/Eisessig 20:1:1

Polyamidplatten: Schleicher & Schüll, TLC Ready-Plastic sheets F 1700, Micro-Polyamid,

Dansylchlorid: Radiochemical Centre Amersham,

Dansylchloridlösung: 2.7 mg/ml Aceton; spez. Aktivität 98 m Ci/Mol,

Zentrifuge: Heraeus-Christ Zeta 20 mit Kapillarrotor.

3.1.5.1. Auswertung der Chromatogramme

Unter der UV-Lampe. Die Dansylaminosäurenderivate sind unter dem UV-Licht als gelblich fluoreszierende Flecken sichtbar. Der fluoreszierende Bereich wird mit einem spitzen Bleistift umrandet, mit einem Mikromesser entfernt und die Radioaktivität im Scintillationsspektrophotometer bestimmt.

Autoradiographie. Zur Dokumentation der ^{14}C-Dansylaminosäurenderivate wird ein 3 • 4 cm^2 Personal-Monitoring-Film D2/D10 (Agfa Gevaert) auf ein Chromatogramm gelegt. Nach 12-24 Stunden Einwirkungszeit wird der Film entwickelt. (Entwickler: Agfa Gevaert, G 230; 54.2 g A + 6.3 g B in 500 ml H_2O lösen; Entwicklungszeit 5 min.)

3.1.6. Gelelektrophorese

Geräte: Elektrophoresegeräte von Hoefer Scientific Instrument (California)
Netzanschluß von Desaga,
Glasröhrchen: Länge 10 cm, innerer Ø 5 mm.

Gele: Länge 6.5 cm, Ø 5 mm.

3.1.6.1. Bereitung der Gele

Die Lösungen für die Gelansätze werden in dem angegebenen Verhältnis (s. Seite 108 und Seite 109) gemischt und mit einer Spritze in die Glasröhrchen, die zuvor mit zwei Lagen Parafilm unten verschlossen wurden, bis zu einer Höhe von 6.5 cm gefüllt. Die Polyacrylamidlösung wird mit 100-150 µl Pufferlösung (Gelpuffer 1:7 verdünnt) überschichtet, um die durch die Adhäsion auftretende Krümmung der Geloberfläche zu vermeiden. Die Gele werden zur Polymerisation stehengelassen und können am nächsten Tag verwendet werden.

Die Polymerisationszeit sollte mindestens 50 min betragen. Durch Variation der Polymerisationskatalysatoren in der Menge kann die richtige Polymerisationszeit angepaßt werden.

Die Gele können längere Zeit im Kühlraum aufbewahrt werden (1-2 Wochen); es empfiehlt sich aber, sie innerhalb einer Woche zu verwenden.

3.1.6.2. Entfernung der Gele aus dem Glasröhrchen

Die Gele werden unter Wasser oben und unten mit einer Kanüle vorsichtig unter ständigem Drehen vom Glasrand abgelöst. Mit dem Gummihütchen einer Pasteurpipette werden sie vorsichtig herausgedrückt und sofort in das Färbemittel gegeben.

3.1.6.3. Bereitung der Proben zum Auftragen auf die Gele

SDS-Extraktion. Die zu untersuchenden Proteine werden mit einer 0.4%igen SDS-Lösung behandelt (0.5 mg Protein/ml 0.4 % SDS). Diese Lösung wird mit einem Zehntel ihres Volumens einer 50%igen Saccharoselösung, die etwas Bromphenolblau enthält, versetzt. Bromphenolblau dient zur Markierung der elektrophoretischen Front. Zur Trennung der Membranproteine werden von dieser Lösung 100 µl aufgetragen, bei Markerproteinen je nach Bandenzahl entsprechend weniger (ca. 10-30 µl). Bei allen beschriebenen Puffersystemen wird die Probe mit dem oberen Laufpuffer überschichtet und die Elektrophorese beendet, wenn die blaue Bromphenolbande sich einige mm vor dem anodischen Gelende befindet.

Tritonextraktion. Membranproteine werden in 0.5 % Tritonlösung in 0.01 M Tris/Cl homogenisiert (1 mg Protein/ml Tritonlösung) und 15 min bei 100000 g zentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig mit einer Spritze abgenommen und 36 Stunden gegen eine 0.4%ige SDS-Lösung dialysiert. Nach der Proteingehaltsbestimmung wird das Dialysat zur Elektrophorese verwendet (= Tritonextrakt).

Der Rückstand wird 2mal in Wasser gewaschen und zentrifugiert (15 min bei 100000 g), danach in einer 0.4%igen SDS-Lösung aufgenommen und elektrophoretisch analysiert (= Rückstand der Tritonextraktion).

Reduktion der Proben mit 2-Mercaptoäthanol. Von einer 0.5%igen Proteinlösung (in 0.4 % SDS) wird 1 ml mit 0.01 ml 2-Mercaptoäthanol versetzt. Das Reaktionsgefäß wird unter Einblasen von Stickstoff verschlossen und etwa 1 min auf offener Flamme erhitzt oder 10 min im kochenden Wasserbad erwärmt. Erst nach vollständigem Abkühlen wird das Glas geöffnet und die Probe auf das Gel aufgetragen.

Carboxymethylierung der reduzierten Probe. Nach Reduktion der Probe mit 2-Mercaptoäthanol (s.o.) wird in das Reaktionsgefäß zu 1 ml Proteinlösung (s.o.) 60 mg Jodoacetamid (= 6 %) gegeben und der pH mit Tris auf pH 8 eingestellt. Die Probe wird 40 min bei 37° C erwärmt. Nach dem Abkühlen wird 3 x 4 Stunden gegen 0.4 % SDS-Lösung dialysiert (Probe zu SDS-Lösung = 1:250).

3.1.6.4. Anfärbung der Proteinbanden im Gel

Anfärbung der Gesamtproteine (47, 85). Als Färbereagenz dient Coomassie-Blau R 250 (Biomol). Lösung: 0.2 % in Essigsäure/Methanol/Wasser (10:50:40 Vol). Die Gele werden zwei Stunden in mit Farblösung gefüllten Reagenzgläsern belassen. Entfärbung wird mit einer Lösung von Essigsäure/Methanol/Wasser (10:50:40) vorgenommen, die Gele werden in 10 % Essigsäure aufgehoben.

Anfärbung der Glykoproteine (= PAS-Färbung). Die Gele werden nacheinander in folgende Lösungen gegeben:

Trichloressigsäure 12.5 %	30 min
Aqua bidest	ca. 20 sec
Perjodsäure 1.5 % in 3%iger Essigsäure	50 min
Schiff's Reagenz (Merck) (in der Kälte und im Dunkeln einwirken lassen)	50 min
Natriummetabisulfid 1.5 %	3 x 10 min

Anschließend wird mehrere Tage in Wasser gewaschen, bis der Farbüberschuß beseitigt ist. Die Gele werden in 10 % Essigsäure aufbewahrt.

3.1.6.5. Auswertung der Gele

Densitometrie.

Densitometer: Joyce-Loebl, Double-Beam Recording Microdensitometer MK III C,

Filter: bei Coomassie-Färbung rot, bei PAS-Färbung blau oder grau.

Die Intensität der Farbbanden wird im Densitometer bei einer Vergrößerung von 1:5 ermittelt.

3.1.6.6. Auswertung der Densitogramme

Molekulargewichtsbestimmung. Die relative Laufstrecke der Proteine wird aus den Densitogrammen ermittelt und dafür vom Maximum der Proteinpeaks das Lot auf die Basislinie

gefällt und vom Papierrand als Bezugspunkt der Abstand gemessen. Die relative Wanderungsstrecke wird gegen den Logarithmus der Molekulargewichte aufgetragen.

Planimetrie.

Planimeter: Aristo 1130 L.

Die Fläche der einzelnen Proteinpeaks wird mit dem Planimeter umfahren und ihr Anteil in % am Gesamtproteingehalt ermittelt, wobei die Summe der Flächen aller Proteinpeaks als 100 % gesetzt wird.

Fotografie. Zur Dokumentation werden die Gele auf einem Lichtkasten fotografiert.

Kamera: Leica MDa mit Visoflex-Ansatz,
Orange-Filter bei Coomassie-Färbung,
Grün-Filter bei PAS-Färbung.

Die Gele werden bei Blende 8 und 1/4 oder 1/8 sec auf einem Lichtkasten fotografiert.

Film: Agfapan 25 (Agfa Gevaert),

Entwickler: Neofin blau.

3.1.6.7. Puffersysteme und Gellösungen

Diskontinuierliches Puffersystem.

Puffer im Gel: 372 mM Tris/HCl;

Vernetzungsgrad T = 12.32, C = 2.6, bei 12%igen Gelen;

Lösungen für den Gelansatz:

A: 48 ml 1 N HCl, 36.6 g Tris, 0.46 ml Aqua bidest. ad 100.0 ml;

B: Aqua bidest.;

C: 48 g Acrylamid, 1.28 g Methylen-Bisacrylamid,
1 ml $K_3 [Fe(CN)_6]$ (750 mg in 100 ml);

P: 140 mg Ammoniumperoxodisulfat $(NH_4)_2 S_2O_8$ in
100 ml H_2O.

Für die Anfertigung von 12%igen Gelen werden die Lösungen gemischt im Verhältnis:

A:B:C:P = 1:1:2:4

Pufferlösungen:

Anodischer Puffer: pH 8.9
121 g Tris, 500 ml 1 N HCl, auf 1 l mit Aqua bidest. auffüllen. Zur Elektrophorese 1:10 mit Wasser verdünnen (0.1 M Tris);

Kathodischer Puffer: pH 8.1
63.2 g Tris, 39.4 g Glycin, auf 1 l mit Wasser auffüllen. Zur Elektrophorese 50 ml dieses Ansatzes + 25 ml 2%ige SDS-Lösung + 425 ml Wasser (0.05 M Tris/Glycin), Spannung: 100 V (konstant), Elektrophoresedauer: 3-4 Stunden.

Kontinuierliches Puffersystem.

Elektrophorese und Gelpuffer: 0.1 M Phosphatpuffer pH 7.1.

Lösungen für den Gelansatz:

A: 0.4 M Phosphatpuffer pH 7.1,
pro 100 ml wird 0.46 ml TEMED zugegeben;

B: 0.8 % SDS-Lösung;

C: 48 g Acrylamid, 1.28 g Methylen-Bisacrylamid,
1 ml 0.75%ige $K_3[Fe(CN)_6]$-Lösung (750 mg/100 ml);

P: 280 mg Ammoniumperoxodisulfat in 100 ml Aqua dest.

Für die Bereitung von 10%igen Gelen werden die Lösungen gemischt im Verhältnis:

A:B:C:P:H_2O = 4:2:3:4:2.7;

Stromstärke: 0.3-5 mA pro Gel zu Beginn der Elektrophorese, dann 3-5 mA;

Elektrophoresedauer: 6-8 Stunden.

3.1.6.8. Isolierung einer Proteinbande aus dem Gel

Zwei 12%ige Gele mit gleicher Proteinbeladung werden einer parallelen Elektrophorese unterworfen. Zur Markierung der zu isolierenden Proteinbande wird ein Gel gefärbt und entfärbt. Das nicht gefärbte Gel wird daneben gelegt und der korrespondierende Abschnitt der gewünschten Bande mit einer Rasierklinge herausgeschnitten. Die übrigen Gelstücke werden zur Kontrolle nachgefärbt.

Weiterverarbeitung zur Trennung auf Mikrogelen. Das Gelstück wird in einem Mikrohomogenisator in 100 µl

0.4 % SDS-Lösung homogenisiert und die Gelreste durch Zentrifugation entfernt. Der Überstand wird auf Mikrogradientengele (s. u.) aufgetragen und im SDS-System fraktioniert.

Weiterverarbeitung zur Aminosäurenbestimmung. Zur qualitativen Aminosäurenbestimmung werden zwei der Gelstücke in 0.5 ml 6 N HCl in einem Hydrolyseröhrchen zerkleinert. Die Suspension wird 24 Stunden bei 120° C hydrolysiert (Röhrchen zuschmelzen). Nach Entfernung der Gelreste wird die Probe in einem Beckman Aminosäuren-Analysator (BC 200) untersucht.

3.1.7. Mikroelektrophorese an kontinuierlichen Gradientengelen

Elektrophoresegerät: Mikro-Diskelektrophorese (Schütt, Göttingen).

Stammlösungen für den Gelansatz:

A: 3.39 g Tris + 6 ml H_2SO_4 1 N + 0.1 ml TEMED, mit etwa 0.6 ml 6 N H_2SO_4 auf pH 8.8 einstellen;

C: 20 g Acrylamid + 400 mg Bis (acrylamido)methan + H_2O ad 7.5 ml;

D: 70 mg Ammoniumperoxodisulfat in 100 ml H_2O.

Zur Herstellung der Gradientengele werden 1 Teil A und 3 Teile C gemischt. Diese Lösung enthält 40 % Acrylamid und 0.8 % Bisacrylamid.

Bereitung der Gele. Eine gereinigte Kapillare wird mit einer Pinzette gefaßt und so lange in Lösung D getaucht, bis sie zur Hälfte gefüllt ist. Der Kapillarstrom wird durch Verschließen der oberen Kapillaröffnung gestoppt. Anschließend wird die Kapillare durch Eintauchen in Lösung A/C vollständig gefüllt. Zur Polymerisation werden die gefüllten Kapillaren in ein kleines Becherglas gestellt, dessen Boden mit Saccharose-Lösung (50%ig) bedeckt ist. Die Polymerisationszeit darf nach frühestens 30 min abgeschlossen sein. Die Gele sind nach zwei Stunden, besser aber erst am nächsten Tag, verwendbar. Sie können in Pufferlösung (1/3 Gelpuffer) in einem verschlossenen Gefäß mindestens eine Woche aufbewahrt werden.

Kapillaren: 5 und 10 µl Drummond Microcaps.
Die Kapillaren müssen mit Javellscher Lauge und Chromschwefelsäure vor Gebrauch gereinigt werden. Die Entfernung der Gele aus der Kapillare erfolgt durch Ausstoßen mit einem Stahldraht.

Elektrophoresepuffer: 6 g Tris + 28.8 g Glycin + 1 g SDS + H_2O ad 1000 ml, pH 8.4.
(Bei Anwendung eines kontinuierlichen Systems wird bei Lösung A der gewünschte Puffer eingesetzt.)

Die Proteinproben werden mit einer Kapillarpipette aufgetragen. Die Probe wird ebenso wie bei der Makroelektrophorese vorher mit Bromphenolblau und Saccharose-Lösung

versetzt und mit dem Elektrophoresepuffer überschichtet.

Elektrophorese: Konstante Spannung von etwa 60 V,

Elektrophoresedauer: etwa 30 min.

Anfärbung der Proteine im Gel erfolgt bei 50° C während 10 min in 0.02 % Coomassie-Blau in Methanol:Essigsäure: Wasser = 50:10:40. Entfärbung bei Zimmertemperatur in Essigsäure:Methanol:Wasser = 7:20:73.
Aufbewahrung in 7.5%iger Essigsäure.
Auswertung im Joyce-Loebl-Microdensitometer bei Vergrößerungen von etwa 1:20 oder 1:50.

4. Literaturverzeichnis

(1) COLEMAN, R.: BBA 300, 1-70 (1973).

(2) KEITH, A.D., SHARNOFF, M., COHN, G.E.: BBA 300, 379-419 (1973).

(3) TRÄUBLE, H., EIBL, H.: In Functional Linkage in Biomuscular Systems, Room Press, N.Y. (1975).

(4) SCHLEGEL, H.G.: Allgemeine Mikrobiologie, Georg-Thieme-Verlag, Stuttgart (1972).

(5) ROBERTSON, J.D.: J. Biophys. Biochem. Cytol. 3, 1043-1047 (1957).

(6) DANIELLI, R.W., DAVSON, H.: J. Cellular Comp. Physiol. 5, 483-494 (1957).

(7) HENDLER, R.W.: Physiol. Rev. 51, 66-97 (1971).

(8) SINGER, S.J., NICOLSON, G.L.: Science 175, 720-731 (1972).

(9) TRÄUBLE, H.: Naturwissenschaften 58, 277-284 (1971).

(10) TRÄUBLE, H.: Naturwissenschaften 61, 344-354 (1974).

(11) KARLSON, P.: Kurzes Lehrbuch der Biochemie, Georg-Thieme-Verlag, Stuttgart (1974).

(12) PETERS, A., VAUGHN, J.A.: In Myelination (ed. Davison, A.N., Peters, A.), pp. 53-79, Verlag Charles C. Thomas, Springfield, Ill. (1970).

(13) RAZIN, S.: BBA 265, 241-296 (1972).

(14) BRETSCHER, M.S.: Science 181, 622-629 (1973).

(15) JULIANO, R.L.: BBA 300, 341-378 (1973).

(16) SCHADÉ, J.P.: Die Funktion des Nervensystems, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart (1969).

(17) LEHNINGER, A.L.: Proc. Nat. Acad. Sci. 60, 1069-1091 (1968).

(18) WHITTAKER, V.P., MICHAELSON, I.A., KIRKLAND, R.J.A.: Biochem. J. 90, 293-303 (1964).

(19) WHITTAKER, V.P.: Naturwissenschaften 60, 281-289 (1973).

(20) WHITTAKER, V.P.: Handbook of Neurochemistry (ed. Lajtha, A.) 2, 327-364, Plenum Press, N.Y. (1969).

(21) MORGAN, I.G., BRECKENRIDGE, W.C., VINCENDON, G., GOMBOS, G.: Proteins of the Nervous System, Raven Press, N.Y., pp. 171-192 (1973).

(22) BURGER, M.M.: In "The Neurosciences Third Study Program" (ed. Schmitt, F.O., Worden, F.G.), pp. 773-782 (1973).

(23) WAEHNELDT, T.V.: Bio Systems 6, 176-187 (1975).

(24) MARCHBANKS, R.M.: Methods in Neurochemistry (ed. Marks, M., Rodnight, R.) 2, 79-97 (1974), Plenum Press, N.Y./London.

(25) MORGAN, I.G., VINCENDON, G., GOMBOS, G.: BBA 320, 671-680 (1973).

(26) DE ROBERTIS, E., ARNAIZ, G.R. de L., ZIEHER, L.M.: J. Neurochem. 10, 225-235 (1963).

(27) KADOTA, K., KADOTA, T.: J. Cell. Biol. 58, 135-151 (1973).

(28) JONES, D.G.: Brain Res. 17, 181-193 (1970).

(29) WHITTAKER, V.P., ESSMAN, G.B., DOWE, G.H.C.: Biochem.J. 128, 833-846 (1972).

(30) MORGAN, I.G., WOLFE, L.S., MANDEL, P., GOMBOS, G.: BBA 241, 737-751 (1971).

(31) COTMAN, C.W., MATTHEWS, D.A.: BBA 249, 380-394 (1971).

(32) CURTIS, D.R., GRAHAM, R.J.: Rev. Pharmacol. 69, 97-222 (1974).

(33) OSBORN, N.N.: Progr. Neurobiol. 1, 301-329 (1973).

(34) JOHNSON, J.C., APRISON, M.H.: Brain Res. 26, 141-178 (1971).

(35) LOGAN, W.J., SNYDER, S.H.: Brain Res. 42, 413-431 (1972).

(36) PETERSON, N.H., RAGHUPATHY, E.: J. Neurochem. 21, 97-110 (1973).

(37) NEUHOFF, V., VAN DER HAAR, F., SCHLIMME, E., WEISE, M.: Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 350, 121-128 (1969).

(38) BRIEL, G., NEUHOFF, V.: Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 353, 540-553 (1972).

(39) NEUHOFF, V.: Micromethods in Molecular Biology, Springer Verlag, Berlin, pp. 85-164 (1973).

(40) DOWDALL, M.J., SIMON, E.J.: J. Neurochem. 21, 969-982 (1973).

(41) SNYDER, S.H., LOGAN, W.J., BENNETT, J.P., ARREGUI, A.: Neurosci. Res. 5, 131-157 (1973).

(42) LOGAN, W.J., SNYDER, S.H.: Brain Res. 42, 413-431 (1972).

(43) WAEHNELDT, T.V., NEUHOFF, V.: J. Neurochem. 23, 71-77 (1974).

(44) WAEHNELDT, T.V., RALSTON, H.J., SHOOTER, E.M.: Neurobiology 3, 215-224 (1973).

(45) WEBER, K., PRINGLE, J.R., OSBORN, M.: Methods in Enzymology 26, 3-27 (1972).

(46) SHAPIRO, A.L., VINUELA, E., MAIZEL jr., J.V.: Biochem. Biophys. Res. Comm. 28, 815-820 (1967).

(47) WEBER, K., OSBORN, M.: J. Biol. Chem. 244, 4406-4412 (1969).

(48) HUGHES, R.L.: Progr. Biophys. Mol. Biol. 26, 189-260 (1973).

(49) BRECKENRIDGE, W.C., MORGAN, I.G.: FEBS Letters 22, 253-256 (1972).

(50) ZACHARIUS, R.M., ZELL, T.E., MORRISON, J.H., WOODLOCK, J.J.: Anal. Biochem. 30, 148-152 (1969).

(51) LAPETINA, E.G., DE ROBERTIS, E.: Life Sci. 7, 203-208 (1968).

(52) BRUNNGRÄBER, E.G.: In Protein Metabolism of the Nervous System (ed. Lajtha, A.), pp. 383-407, Plenum Press, N.Y. (1970).

(53) GROSSFELD, R.M., SHOOTER, E.M.: J. Neurochem. 18, 2265-2277 (1971).

(54) WAEHNELDT, T.V., NEUHOFF, V.: Naturwissenschaften 59, 232-239 (1972).

(55) RÜCHEL, R., MESECKE, S., WOLFRUM, D.I., NEUHOFF, V.: Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 355, 997-1020 (1974).

(56) MAIZEL jr., J.V.: Methods in Virology 5, 179-246 (1971).

(57) MAIZEL jr., J.V., SUMMERS, D.F., SCHARFF, M.D.: J. Cell Physiol. 76, 273-288 (1970).

(58) REYNOLDS, J.A., TANFORD, C.: J. Biol. Chem. 245, 5161-5165 (1970).

(59) FISH, W.W., REYNOLDS, J.A., TANFORD, C.: J. Biol. Chem. 246, 5166-5168 (1970).

(60) KOHLRAUSCH, F.: Ann. Phys. 62, 209-239 (1897).

(61) Ornstein, L.: Ann. N.Y. Acad. Sci. 121, 321-349 (1964).

(62) JOVIN, T.M.: Ann. N.Y. Acad. Sci. 209, 477-496 (1973).

(63) WAEHNELDT, T.V., MANDEL, P.: Brain Res. 40, 419-436 (1972).

(64) DAVIS, B.J.: Ann. N.Y. Acad. Sci. 121, 404-427 (1964).

(65) REYNOLDS, J.A., TANFORD, C.: Proc. Nat. Acad. Sci. 66, 1002-1007 (1970).

(66) NEVILLE jr., D.M., GLOSSMANN, H.: J. Biol. Chem. 246, 6335-6338 (1971).

(67) GHABRIAL, S.A., LISTER, R.M.: Virology 51, 485-488 (1973).

(68) SCHMIDT-ULLRICH, R., FERBER, E., KNÜFERMANN, H., FISCHER, H., HOELZL-WALLACH, D.F.: BBA 332, 175-191 (1974).

(69) TANFORD, C.: The Hydrophobic Effect (ed. Wiley, J.) New York (1973).

(70) CLELAND, W.W.: Biochemistry 3, 480-482 (1964).

(71) BEYER, H.: Lehrbuch der organischen Chemie. S. Hirzel Verlag, Leipzig (1968).

(72) RÜCHEL, R., MESECKE, S., WOLFRUM, D.I., NEUHOFF, V.: Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 354, 1351-1368 (1973).

(73) MARGOLIS, J., KENRICK, V.G.: Analyt. Biochem. 25, 347-362 (1968).

(74) HIRS, C.H.W.: Meth. Enzym. 11, 197-203 (1967).

(75) LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, H.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J.: J. Biol. Chem. 193, 265-275 (1951).

(76) DODGE, J.E., MITCHELL, C., HANAHAN, D.J.: Arch. Biochem. Biophys. 100, 119-130 (1963).

(77) JOHNSON, M.K.: Biochem. J. 77, 610-618 (1969).

(78) BERGMEYER, H.U.: Methoden der enzymatischen Analyse. Verlag Chemie, pp. 736-740 (1962).

(79) ELLMAN, G.L., COURTNEY, K.D., ANDERS, Jr., V., FEATHERSTONE, R.M.: Biochem. Pharmacol. 7, 88-95 (1961).

(80) EMMELOT, P., BOS, C.J., BENEDETTI, E.L., RÜMKE, P.H.: BBA 90, 126-145 (1964).

(81) FISKE, C.H., SUBBAROW, Y.: J. biol. Chem. 66, 375-400 (1925).

(82) Test-Fibel, Boehringer Mannheim GmbH. (1969).

(83) GATT, S., RAPPORT, M.: BBA 113, 567-576 (1966).

(84) WURTMAN, R.J., AXELROD, J.: Biochem. Pharmacol. 12, 1439-1440 (1963).

(85) FAZEKAS DE ST. GROTH, S., WEBSTER, R.G., DATYNER, A.: BBA 71, 377-391 (1963).

(86) BRECKENRIDGE, W.C., MORGAN, I.G., ZANETTA, J.P., VINCENDON, G.: BBA 320, 681-686 (1973).

(87) TRÄUBLE, H., OVERATH, P.: BBA 307, 491-512 (1973).

Teile der Dissertation sind in folgenden Veröffentlichungen enthalten:

RICHTER-LANDSBERG, C., RÜCHEL, R., WAEHNELDT, T.V.: Biochem. Biophys. Res. Comm. 59, 781-788 (1974).

RÜCHEL, R., RICHTER-LANDSBERG, C., NEUHOFF, V.: Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem., im Druck (1975).

RICHTER-LANDSBERG, C., NEUHOFF, V.: Naturwissenschaften, im Druck (1975).

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von April 1973 bis August 1975 am Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin in Göttingen.

Herrn Prof. Dr. V. Neuhoff danke ich für die Überlassung des Themas und für die großzügige Förderung meiner Arbeit in seiner Gruppe. Herrn Prof. Dr. G. Gottschalk bin ich für sein Interesse und die Übernahme des Referats dankbar.

Herrn Dr. T.V. Waehneldt möchte ich herzlich danken für die Anregung zu dieser Arbeit und seine Hilfe und Unterstützung bei der Durchführung.

Besonderer Dank gilt auch Herrn Dr. R. Rüchel, der in zahlreichen Diskussionen und mit vielen Anregungen die Arbeit gefördert hat.

Mein Dank gilt außerdem allen Mitarbeitern der Forschungsstelle Neurochemie, die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben, und Fräulein H. Früh für ihre technische Assistenz bei der Durchführung der Experimente.

Herrn Dr. P.H. Richter danke ich für hilfreiche Diskussionen über die Theorie der Elektrophorese und sein förderndes Interesse.

Weiterhin bin ich Herrn Dr. F. Seela für seine stete Diskussionsbereitschaft dankbar.

Für die Hilfe und Einführung in die Technik der Elektronenmikroskopie danke ich Frau A. Wolff und Herrn Dr. C. Krieg.

Lebenslauf

7. 1. 1948	in Göttingen als Tochter des Physiko-Chemikers Dr. August Landsberg und seiner Ehefrau Elisabeth geb. Wiegand geboren
1954 - 1958	Besuch der Grundschulen in Oberhausen, Mannheim und Wuppertal
1958 - 1966	Besuch der Gymnasien in Wuppertal, Glückstadt und Heilbronn
Herbst 1966	Abitur am Elly-Heuss-Knapp-Gymnasium in Heilbronn
1966 - 1968	Apothekerpraktikantin in der Löwen-Apotheke, Göttingen
Sept. 1968	Pharmazeutisches Vorexamen in Hildesheim
1968 - 1969	Studium der Pharmazie an der Hochschule Bamberg
1969 - 1971	Fortsetzung des Studiums der Pharmazie an der Philipps-Universität in Marburg/Lahn
Okt. 1971	Pharmazeutische Staatsprüfung
Dez. 1971	Approbation als Apothekerin
1972	Wissenschaftliche Hilfskraft am Physiologisch-chemischen Institut der Philipps-Universität in Marburg
seit 1973	als Stipendiatin der Max-Planck-Gesellschaft am Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin in Göttingen in der Forschungsstelle Neurochemie tätig